

Neue Ansätze zur zellulären Charakterisierung von Autoimmunerkrankungen an Vollblut



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT III (BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN) DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Sven Olaf Friedrich
aus
Neustadt bei Coburg
Juli 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.07.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Gerd Schmitz

Prüfungsausschuss:

- | | |
|---------------|-----------------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Armin Kurtz |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Georg Löffler |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Gerd Schmitz |
| 3. Prüferin: | Prof. Dr. Rosemarie Baumann |

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Adapterprotein
Apaf	Apoptotischer proteaseaktivierender Faktor
APC	Allophykozyanin
APS	Antiphospholipidsyndrom
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BFA	Brefeldin A
BLC	B-Lymphozyten-Chemoattraktor
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity determining region
C-FDA	Carboxy-Fluoreszeindiazetat
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CPDA	Zitrat, Phosphat, Dextrose, Azetat
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozytenassoziiertes Antigen
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DD	Todesdomäne
DFZ	Durchflusszytometer
DISC	Todinduzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne

FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FSC	Vorwärtsstreulicht
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
h	Stunde
HEV	Venolen mit hohem Endothel
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HS	Humanserum
IDDM	Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol pro Liter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NK	Natürliche Killer
nm	Nanometer
NOD	Nonobese diabetic
PALS	Periarterioläre lymphatische Scheide
PBL	Peripherer Blutleukozyt
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCC	Cytochrom C von Tauben
PE	Phykoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyllprotein
PMA	Phorbol-Myristat-Azetat
PMT	Lichtverstärkungsröhre
PS	Phosphatidylserin

RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI1640	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SLC	sekundäres Lymphgewebe Chemokin
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
sog.	so genannt
SSC	Seitwärtsstreulicht
Stdabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanustoxoid

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
Inhaltsverzeichnis	4
Abstract	8
1 Einleitung	10
1.1 Entstehung und Folgen von Autoimmunerkrankungen	10
1.1.1 Allgemeine Mechanismen der Autoimmunerkrankungen	10
1.1.2 Autoimmunerkrankungen	11
1.1.2.1 Insulinpflichtiger Diabetes mellitus	11
1.1.2.2 Systemischer Lupus Erythematosus (SLE)	14
1.1.2.3 Sjögren's Syndrom	15
1.1.2.4 Rheumatoide Arthritis (RA)	16
1.2 Antigen-spezifische Immunantwort	18
1.2.1 T-Zellen und ihre Funktion	18
1.2.1.1 T-Zellrezeptor (TCR) von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	18
1.2.1.2 Interaktionen von Th-Zellen mit Dendritischen Zellen	19
1.2.2 Dendritische Zellen und ihre Funktion	21
1.2.2.1 Differenzierung und Migration Dendritischer Zellen	21
1.2.2.1.1 Analyse von Blutvorläuferzellen und Generierung von unreifen Dendritischen Zellen	21
1.2.2.1.2 Reifung der Dendritischen Zellen	24
1.2.2.1.3 Migration der Dendritischen Zellen in das Gewebe	25
1.2.2.2 Funktion Dendritischer Zellen	26
1.2.2.2.1 Aufnahme von Antigenen durch die Dendritischen Zellen	26
1.2.2.2.2 Antigenprozessierung im MHC-I-System	26
1.2.2.2.3 Antigenprozessierung im MHC-II-System	28
1.2.2.2.4 Antigenprozessierung im CD1-System	29
1.2.3 CD1-restringierte T-Zellen	32
1.2.4 Aufbau und Funktion des sekundären Lymphgewebes	33
1.2.4.1 Einwanderung der Leukozyten in das sekundäre Lymphgewebe	33
1.2.4.2 Verteilung der Leukozyten im sekundären Lymphgewebe	34

	Seite
1.2.5	Aktivierung von T-Zellen und ihre Detektion 35
1.2.5.1	T-Zellaktivierung 35
1.2.5.2	Methoden zur Detektion aktivierter T-Zellen 36
1.2.5.3	Aktivierungsmarker und kostimulatorische Rezeptoren auf T-Zellen 37
1.3	T-Zellgedächtnis 41
1.3.1	Proliferation und Differenzierung der Th-Zellen 41
1.3.2	Interaktionen von Th- und B-Zellen 44
1.3.3	Th-Zellen als Teil des Immungedächtnisses 45
1.3.4	Zirkulation der Th-Zellen im Organismus 45
1.4	Entfernung der T-Zellen über Apoptose 46
1.4.1	Bedeutung der Apoptose 46
1.4.2	Induktion der Apoptose über CD95 47
1.4.3	Induktion der Apoptose über andere Mechanismen 48
1.4.4	Exekution und Regulation der Apoptose 50
1.4.5	Folgen der Apoptoseinduktion 51
1.4.6	Analytik apoptotischer Zellen 52
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit 53
2	Materialien und Methoden 54
2.1	Materialien 54
2.1.1	Verwendete Antikörper 54
2.1.2	Verwendete fluoreszierende Substanzen 56
2.1.3	Verwendete Peptide 56
2.1.4	Sonstige Reagenzien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien 57
2.1.5	Verwendete Geräte und Software 59
2.1.6	Blutproben 59
2.1.7	Statistische Auswertung 59
2.2	Methoden 60
2.2.1	Methodenoptimierung und Anwendung verschiedener Stimulationsansätze 60
2.2.2	Methoden zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen und anderer Leukozyten mit niedriger Frequenz 63

	Seite
2.2.3 Methoden zur Induktion und Detektion der T-Zell-Apoptose	66
2.2.4 Durchflusszytometer (DFZ)	69
2.2.4.1 Flüssigkeitssystem des DFZ	69
2.2.4.2 Optisches System und Datenverarbeitung	69
2.2.4.3 Gemessene Parameter: FSC und SSC	71
2.2.4.4 Gemessene Parameter: FL-1 bis FL-4	72
2.2.4.5 Kalibration des DFZ	72
2.2.5 Auswertung der Messdaten	73
2.2.6 Serologische HLA-Typisierung	81
3 Ergebnisse	83
3.1 Optimierung der Vollblutstimulation im Modellsystem und Anwendung	83
3.1.1 Protokoll zur Kurzzeitstimulation	84
3.1.2 Vergleich von drei Antikoagulanzen	85
3.1.3 Ermittlung der optimalen Zelldichte	88
3.1.4 Zellernte mit und ohne EDTA	91
3.1.5 Ermittlung des optimalen Analysezeitpunkts	93
3.1.6 Optimierung der Detektion aktivierter T-Zellen	95
3.1.7 Austestung verschiedener Proteaseinhibitoren	97
3.1.8 Optimierung der Aprotininkonzentration	99
3.1.9 Vergleich der Aprotininwirkung im Zeitverlauf	101
3.1.10 Stimulation von Vollblut mit lipophilen Substanzen	103
3.1.11 Erprobung stimulierender TT-Peptide	106
3.1.12 Ermittlung der optimalen TT-Peptidkonzentration	109
3.2 Kontrolle der Spezifität der Stimulationen	111
3.2.1 Stimulation von Nabelschnurblut mit TT	112
3.2.2 Identifizierung der TT-reaktiven Kompartimente	115
3.2.3 Peptidkinetik und peptidreaktive Kompartimente	118
3.2.4 Detektion CMV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten	124
3.3 Anwendung im IDDM-System	127
3.3.1 Stimulation mit GAD-Peptiden für einen bis fünf Tage	128
3.3.2 Stimulation mit GAD-Peptiden für drei und vier Tage	137

	Seite
3.3.3	Kontrolle der Spezifität der GAD-Peptidstimulation 142
3.4	Untersuchungen zur Apoptose bei Autoimmun- patienten 148
3.4.1	Erprobung von fünf verschiedenen Apoptosestimuli 149
3.4.2	Vergleich von drei Apoptoseinduktoren an T-Zellen von Auto- immunpatienten und Kontrollpersonen 151
3.4.3	Induktion der T-Zellen von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen mit 2-Deoxy-D-ribose 157
3.4.4	Induktion der T-Zellen von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen mit Anti-CD95 161
3.5	Charakterisierung von NK-T-Zellen und Dendritischen Zellen im CD1-System 167
3.5.1	Bestimmung der Frequenz von NK-T-Zellen im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen 168
3.5.2	Bestimmung der Frequenz von CD1c ⁺ und CDd ⁺ Dendritischen Zellen im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen 170
4	Diskussion 173
4.1	Stimulationsansatz 173
4.2	Spezifität der Stimulation 178
4.3	GAD-Reaktivität 181
4.4	Apoptoseinduktionsansatz 184
4.5	CD1-relevante Leukozyten 188
5	Zusammenfassung 189
6	Literaturverzeichnis 192
7	Anhang 260

Abstract

Autoimmune diseases represent an antigen-specific disturbance of T cell activation in the interaction between antigen-presenting cells and T cells in combination with a simultaneous abnormality in the modulation of T cell survival in the context of apoptosis regulation. One goal of this thesis was the identification and characterization of antigen-specific T cells in whole blood using a simple stimulation assay. In addition, the analysis of differences in apoptosis of T cells and in CD1-expressing or reactive leukocytes from peripheral blood between healthy persons and patients with autoimmune diseases was investigated.

In this thesis a model system could be established, with which the activation of T lymphocytes by the stimulus tetanus toxoid (TT) in whole blood is measured in the flow cytometer as the upregulated expression of activation antigens. The optimization of the assay parameters (Lithium heparin as anticoagulant, dilution with 66 % medium, harvesting the cells without EDTA, incubation for at least 22 h) and the detection of these activated T cells (sequential staining of the activation markers CD25, CD69, CD134 and CD154) resulted in a specific and reproducible response of a distinct subpopulation of 1 to 3 % positive T lymphocytes. The inhibition of secretion or degradation with the reagents Brefeldin A, Bestatin or Aprotinin did not increase the sensitivity of antigen detection.

On the other hand antigen-positive T cells could be already measured with single peptides of TT, without any costimulation. The parameters for this stimulation were also tested and optimized (concentration of peptide: 40 µg/ml, 24 h incubation minimum).

The characterization of the T cells activated by TT, or its peptides, was based on the memory phenotype, confirming a reaction carried out by the immune memory. This was demonstrated by evaluating the assay also with whole blood samples of non-vaccinized donors (cord blood), which did not result in activated antigen-positive T cells.

After the development of the detection assay for TT-specific T cells in whole blood as a simple, fast and convenient method, it was used for the identification of glutamic acid decarboxylase (GAD)-reactive T lymphocytes as an antigen relevant in autoimmune disease. The GAD-specific T cells are thought to play a

crucial role in the development and execution of an autoimmune reaction against GAD and insulin-producing β cells in the pancreas inducing type I diabetes mellitus. With this assay the identification of activated T cells (0.5 to 1.5 %) was possible following 72 h incubation. In a pilot study blood samples of healthy donors and patients with type I diabetes were incubated and stimulated by different peptides of GAD in parallel. The results revealed that the majority of the activated T cells expressed CD25, while only a weak stimulation was detected with the antigen CD134. On the other hand GAD-reactive T cells could be found in the whole blood of patients and controls independently from type I diabetes mellitus, which confirms the results of other working groups.

The induction of apoptosis (e.g. by CD95) in T cells is a regulatory mechanism limiting cell activation. Therefore an apoptosis-inducing assay was implemented by which disturbances in apoptosis could be investigated in autoimmune diseases. The sugar 2-deoxy-D-ribose was found as a reliable stimulus and it could be shown that the apoptosis in T cells from patients suffering from Sjogren's syndrome or SLE is increased in comparison to healthy donors. These differences between those groups were also found by analyzing CD95 antibody-induced apoptosis and are in agreement with other published results.

A characterization of CD1-expressing and CD1-reactive leukocytes was performed in these autoimmune patients. The molecules of the CD1 system present degraded and lipophilic antigens to T cells, whereas loaded CD1d stimulates the special subpopulation of NK-T cells. In accordance with published absolute numbers only small frequencies of NK-T cells were measured in the whole blood of healthy donors and patients with autoimmune diseases. However decreased absolute numbers of CD1c⁺ and CD1d⁺ dendritic cells could be determined for all autoimmune patients as shown by other groups.

Both, the functional characterization of antigen-specific T cells and T cell apoptosis, as well as the phenotyping of CD1-relevant leukocytes could be established successfully in this thesis. Employing these methods it was possible to measure clear differences between the individual groups. Therefore the methods developed in this thesis are valid, convenient and useful for the analysis of pathogenetic parameters of autoimmune diseases in a clinical study.

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Folgen von Autoimmunerkrankungen

Die antigenspezifische Immunantwort und die sie ausführenden Leukozyten unterliegen einer strikten Regulation und Kontrolle. Dies dient dazu ein Überschießen der Immunantwort zu verhindern und den aktivierten Zustand nach einer gewissen Zeit auf Normalmaß zurückzuführen. Kommt es in diesem ausbalancierten System zu einem Fehler, kann dies in letzter Konsequenz zu einer Autoimmunerkrankung führen.

1.1.1 Allgemeine Mechanismen der Autoimmunerkrankungen

Für die Generierung einer Autoimmunreaktion konnten bisher drei Mechanismen identifiziert werden, die einzeln oder in Kombination an der Pathogenese ursächlich sind:

Die fehlerhafte Erkennung von körpereigenen Antigenen als vermeintlich fremd, die sog. Mimikry, wurde für die Induktion einer Autoantigenreaktion bei Diabetes Typ I, Multipler Sklerose und Guillain-Barre Syndrom nachgewiesen [158; 290; 418]. Eine Schlüsselrolle konnte hierbei in mehreren Mausmodellen neben den antigenspezifischen T-Zellen auch den Dendritischen Zellen (DCs) zugewiesen werden. Bereits eine Gabe von wenigen mit degradierten Antigenen beladenen DCs kann eine Autoimmunreaktion reversibel induzieren (Übersicht in [234]).

Ein weiterer induktiver Mechanismus wird in der Kostimulation von autoantigen-spezifischen T-Zellen gesehen. Hierbei kann beispielsweise eine antivirale Immunreaktion über die sezernierten Zytokine eine anti-autogene Reaktion verstärken. Untersuchungen an Patienten mit Multipler Sklerose konnten zeigen, dass virale Infektionen den Verlauf der Krankheit verschärfen [11].

Auch eine Störung der T-Zell-Apoptose als Mechanismus zur Begrenzung der T-Zellaktivierung wird als mögliche Ursache einer Autoimmunkrankheit gesehen. Die Funktionslosigkeit von CD95 oder CD95L, die in aktivierten T-Zellen den programmierten Zelltod induzieren, infolge einer Mutation ihres Gens führt bei Menschen oder bei Mäusen zu schweren Schädigungen (siehe **1.4.2**).

1.1.2 Autoimmunerkrankungen

Aus der Vielzahl der beschriebenen Erkrankungen, die durch das körpereigene Immunsystem induziert werden können, sind nachfolgend vier relevante Beispiele dargestellt. Die beteiligten Leukozyten, ihre Funktionen und die wesentlichen Mechanismen sind in den Kapiteln **1.2** bis **1.4** beschrieben.

1.1.2.1 Insulinpflichtiger Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus wird in zwei Gruppen eingeteilt. Der Diabetes Typ I (Insulin dependent diabetes mellitus: IDDM) wird als Autoimmunkrankheit definiert, bei dem die Zellen des Immunsystem die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zerstören und der Mangel an Insulin eine Hyperglykämie verursacht (Übersicht in [384]). Demgegenüber gilt der Diabetes Typ II als Krankheit, bei dem es aufgrund einer Insulinresistenz zum überhöhten Blutzuckerspiegel kommt (Übersicht in [333]).

Zwar konnte man eine Häufung bestimmter Epitope auf dem β -Molekül des HLA-DQ unter IDDM-Patienten entdecken, jedoch zeigte eine Studie an eineiigen Zwillingen ein Auftreten der Krankheit bei beiden erbgleichen Geschwistern nur in weniger als der Hälfte der untersuchten Fälle [30; 157]. Daher wird von einer vererbten Disposition ausgegangen, die in Kombination mit weiteren nicht bekannten Faktoren zur Induktion der Autoimmunreaktion mit den erwähnten Folgen führt. Die Existenz eines Tiermodells in Form der sog. Nonobese diabetic (NOD)-Maus, die spontan IDDM entwickelt, ermöglicht weitere Einblicke in die Pathogenese der Krankheit und eröffnet einen experimentellen Zugang.

Sowohl bei Patienten als auch bei NOD-Mäusen konnten mehrere körpereigene Antigene identifiziert werden, gegen die Autoantikörper gebildet werden. Ein erster in Patientenblut identifizierter Autoantikörper ist reaktiv gegenüber den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse [47]. Auch gegen das von ihnen sezernierte Insulin und seinen Rezeptor können Antikörper gefunden werden [247; 293].

Als die wichtigsten Antigene für die Entstehung des Diabetes sieht man jedoch das IA-2 und die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) 65. Das IA-2 wurde als Transmembranprotein aus der Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen charakterisiert. Es wird auch von humanen Inselzellen exprimiert, und bei 66 % der IDDM-Patienten können Autoantikörper gegen IA-2 gefunden werden [212].

Das bekannteste Autoantigen des IDDM ist jedoch die GAD (Übersicht in [184]). Dieses Enzym dient zur Synthese von γ -Aminobutansäure, einem inhibitorischen

Neurotransmitter, der sowohl von den β -Zellen des Pankreas als auch von einigen neuronalen Zellen exprimiert wird [22]. Die GAD liegt in zwei Varianten vor: Eine leichtere Variante mit 65 kDa (585 Aminosäuren) und eine schwerere Variante mit 67 kDa (594 Aminosäuren) für die jeweils ein codierendes Gen auf unterschiedlichen Chromosomen ermittelt werden konnte [97; 193]. Beim Menschen exprimieren die β -Zellen des Pankreas hauptsächlich GAD65, während bei den Mäusen die gleichen Zellen GAD65 und GAD67 synthetisieren [198]. Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie zeigten, dass die GAD65 nach ihrer Expression in der Plasmamembran verankert und nach einer Modifikation abgespalten wird [64]. Dies könnte den Übergang der Autoimmunreaktion gegen das Protein GAD65 auf die β -Zellen des Pankreas erklären.

Die Beteiligung der GAD an der Induktion der Autoimmunreaktion konnte neben dem Nachweis der Autoantikörper auch über die Stimulation von PBLs aus dem Blut der Patienten demonstriert werden [21]. Genauere Untersuchungen ergaben, dass in T-Zellen aus dem Vollblut von Patienten sowohl von GAD65 und GAD67 als auch von einzelnen Peptiden der beiden Enzyme eine Stimulation induziert werden kann [156; 232]. Es zeigte sich, dass mehrere Sequenzen des GAD-Proteins stimulierende Eigenschaften haben; eine bestimmte Sequenz der GAD ist dem Hüllprotein des Cocksackie Virus homolog. Dies nährte Spekulationen, dass IDDM durch eine Cocksackie-Infektion induziert werden kann [20]. Weitere Studien mit GAD-Peptiden ergaben reaktive T-Helferzellen (Th-Zellen) und Zytotoxische Lymphozyten (CTLs) im Vollblut der Patienten, die Möglichkeit T-Zelllinien zu generieren und eine Abhängigkeit der Stimulation vom HLA-Typ [95; 297]. Darüber hinaus ist es möglich durch den adoptiven Transfer von humanen GAD-reaktiven Th₁-Zelllinien den IDDM in jungen, gesunden und immuntoleranten NOD-Mäusen zu induzieren [424].

Für die Pathogenese des IDDM existiert eine Vorstellung über die einzelnen Abläufe, die hauptsächlich aus den Untersuchungen am NOD-Mausmodell gewonnen wurden.

Am Beginn der Autoimmunreaktion steht der Verlust der Toleranz gegenüber GAD, dem der Toleranzverlust gegenüber anderen Autoantigenen folgt [194]. Umgekehrt kann durch die Einleitung einer Toleranz gegenüber GAD durch die Impfung junger und noch gesunder NOD-Mäuse mit GAD65 oder GAD67 die Autoimmunantwort verhindert werden [91; 302]. Diese Toleranz kann auch über die orale Gabe des rekombinanten Proteins respektive die nasale Gabe

verschiedener GAD-Peptide induziert werden. Dafür ist die Entwicklung einer Th₂-Antwort ausschlaggebend, während eine Th₁-Antwort IDDM induziert [239; 382].

Dem Toleranzverlust folgt die Einwanderung von Antigenpräsentierenden Zellen (APZs) in die Langerhans-Inseln des Pankreas. An NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Monozyten, Makrophagen und DCs den Pankreas infiltrieren [178]. Bereits vorher konnte demonstriert werden, dass eine spezifische Blockierung der Makrophagen mittels Silikon die Entstehung von IDDM in der NOD-Maus inhibiert. Die Makrophagen sind damit maßgeblich an der Induktion der Immunantwort beteiligt [215]. Die Sekretion verschiedener Zytokine durch die APZs (z. B. Interleukin (IL)-1 β , Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- α , etc.) wirkt chemotaktisch auf andere infiltrierende Leukozyten (z. B. T-Zellen) und toxisch auf die β -Zellen selbst [299]. B-Zellen wandern ebenfalls in die Langerhans-Inseln der NOD-Mäuse ein und fungieren als APZs, was über ihre spezifische Blockierung und dem Ausbleiben des IDDM gezeigt werden konnte [344].

Mit den APZs wandern Th-Zellen und CTLs zytokingesteuert in den Pankreas ein, und es kommt zur Bildung einer Art lymphatischen Gewebes. Diese sog. Insulitis konnte sowohl in NOD-Mäusen als auch in Menschen nachgewiesen werden [144; 148; 173]. Die T-Zellen sind für den Ausbruch des IDDM ebenfalls essentiell. Die intravenöse Gabe eines CD3-Antikörpers an neugeborene NOD-Mäuse führt zu einem Absinken der T-Zellzahl und verhindert den IDDM [148]. Umgekehrt kann über den adoptiven Transfer aller T-Zellen oder nur der Th-Zellen von erkrankten NOD-Mäusen auf gesunde immundefiziente Mäuse der Diabetes induziert werden. Dagegen ist der Transfer von CTLs genauso wirkungslos, wie die gleichzeitige Blockierung der Makrophagen mit dem Transfer der T-Zellen in die gesunden immundefizienten Mäuse [65].

Die weitere Untersuchung von Th-Zellen und CTLs ergab für beide Subpopulationen spezifische Aufgaben in der Pathogenese des IDDM (Übersicht in [416]). Die Th-Zellen haben vermutlich eine wichtige Vermittlerrolle, was durch die Gabe von Antikörpern gegen CD154 an noch gesunden NOD-Mäusen demonstriert werden konnte. Die Unterbindung der Th-Zellinteraktion mit den DCs (siehe **1.2.1.2**) und eine verminderte Differenzierung zu Th₁-Zellen verhindern die Entstehung des IDDM [24]. Weitere Experimente konnten zeigen, dass eine gezielte Insulingabe an gesunde NOD-Mäuse zur Tolerierung dieses Autoantigens

und zur Entwicklung der Th-Zellen zu Th₂-Zellen führt [383]. Somit kann man schließen, dass für die Pathogenese des IDDM die Th₁-Zellen und für die Toleranz gegenüber den Autoantigenen die Th₂-Subpopulation ursächlich sind.

Die Zerstörung der β -Inselzellen ist weitgehend eine Wirkung der CTLs. Die Generierung von NOD-Mäusen mit defektem CD95-Gen oder zerstörtem Perforin-Gen erbringt einen Phänotyp bei dem der Ausbruch des IDDM entweder unterbunden oder stark minimiert ist [174; 189].

1.1.2.2 Systemischer Lupus Erythematosus (SLE)

Der SLE ist im Gegensatz zum IDDM eine Autoimmunkrankheit, die verschiedene Organe betrifft und keine einheitliche Manifestation aufweist. Es wurden 11 verschiedene Kriterien (Hautveränderungen, Fotosensitivität, Nephritis, hämatologische Veränderungen, Autoantikörper, etc.) definiert, von denen mindestens vier nötig sind, um die Diagnose zu stellen [153].

Wie beim IDDM ergaben genealogische Studien und der Befund, dass bei eineiigen Zwillingen beide Geschwister nur in 24 % der Fälle erkrankt sind, eine genetische Disposition für SLE. Hinzu kommt ein Frauenanteil von ca. 90 % an der Gesamtheit der Patienten [77; 122]. Weiterhin konnte bei Japanern eine Assoziation von SLE mit Polymorphismen im CD152-Gen ermittelt werden [1]. Eine vermutete Mutation im CD95L-Gen konnte jedoch nicht als Ursache festgestellt werden [202]. Eine Mutation des CD95- oder CD95L-Gens führt beim Menschen zum Autoimmun-lymphoproliferativen Syndrom (siehe **1.4.2**).

Verursacht von hyperaktiven B-Zellen werden in SLE-Patienten verschiedene Autoantikörper identifiziert, die als Antigen den Zellkern, DNA, Histone, Ribonukleoproteine oder die Nukleoproteine Ro und La binden können [126]. Diese und andere Autoantikörper können an verschiedenen Stellen im Organismus binden und zu chronischen Entzündungen führen, die sich in neuronalen Schädigungen, veränderten Zytokinprofilen, Thrombosen, Infarkten und Organschäden manifestieren (Übersicht in [342]). Darüber hinaus kann man bei vielen Patienten ein sekundäres Antiphospholipid-Syndrom (APS) diagnostizieren, bei dem Antikörper gegen körpereigene Phospholipide gebildet werden und das zu zusätzlichen Komplikationen führt (Übersicht in [345]). Zu diesen Störungen addieren sich auch bei der Mehrheit der Patienten ein Mangel an Komplementmolekülen, was eine Defizienz in der Abwehr von Fremdorganismen zur Folge hat (Übersicht in [304]).

Bezüglich der Apoptose in den Leukozyten konnten bisher nur wenige Unterschiede zu normalen Probanden gefunden werden (Übersicht in [39]). Die Expression von CD95 auf und von Bcl-2 in den T-Zellen der SLE-Patienten wurde als erhöht beschrieben. Die Induktion der Apoptose in den T-Zellen mit Anti-CD95 erfolgt ohne Besonderheiten [286]. Dennoch werden im Patientenblut erhöhte Werte an apoptotischen T-Zellen gemessen [301]. Eine mögliche Ursache dafür zeigte ein Funktionstest auf, bei dem *in vitro* generierte Makrophagen der SLE-Patienten die autologen und apoptotischen Leukozyten nur schlecht phagozytieren konnten [151]. Generell konnten aber bisher keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen dem Immunsystem und dem Ausbruch der Krankheit bewiesen werden.

1.1.2.3 Sjögren's Syndrom

Eine dem SLE verwandte Autoimmunerkrankung ist das Sjögren's Syndrom. Bei beiden Erkrankungen sind ca. 90 % der Patienten weiblich. Im Gegensatz zum SLE mit seinen multiplen Inflammationsloci sind beim Sjögren's Syndrom die Orte der Inflammation exokrine Gewebe, wie die Mundschleimhaut oder die Tränendrüsen. Die Krankheit kann auch in Kombination mit SLE als sekundäres Syndrom auftreten (Übersicht in [182]).

Auch für das Sjögren's Syndrom wurde eine Liste mit 6 verschiedenen Diagnostikkriterien erstellt, die mit anderen Kriterien zusammen eine Klassifikation dieser Erkrankung ermöglicht [403]. Parallel zum SLE können auch bei der Mehrheit der Patienten mit Sjögren's Syndrom Autoantikörper gegen die Nukleoproteine Ro und La identifiziert werden [377]. Darüber hinaus konnte mit α -Fodrin, einem Protein des Zytoskeletts, ein spezifisches Autoantigen charakterisiert werden. Im Blut der Patienten wurden sowohl Antikörper gegen α -Fodrin als auch Fodrin-reaktive T-Zellen beschrieben [143].

Analog dem Pankreas des IDDM-Patienten konnte beim Sjögren's Syndrom eine Infiltration des sekretorischen Gewebes durch mononukleäre Zellen nachgewiesen werden. Eine immunhistologische Untersuchung zeigte, dass diese Zellen entweder CD40 oder CD154 erhöht exprimieren, was auf DCs und aktivierte Th-Zellen schließen lässt [285]. Auf der Zelloberfläche der betroffenen Gewebe konnte passend dazu eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 nachgewiesen werden [245].

Auch beim Sjögren's Syndrom wurden Untersuchungen angestellt, die die T-Zellen bezüglich ihrer Apoptose charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass bei den Patienten die Gene für CD95 und CD95L keine signifikanten Polymorphismen oder Mutationen besitzen [46]. Jedoch ergab eine weitere Studie, dass die Frequenz der CD95-vermittelten Apoptose bei den infiltrierenden Th-Zellen und CTLs deutlich vermindert ist [284]. Im Gegensatz dazu konnte man bei den Schleimhautzellen der Sjögren-Patienten eine erhöhte Apoptoserate detektieren [307]. Die Ursache für die Infiltration und Zerstörung der exokrinen Gewebe blieb bisher unentdeckt.

1.1.2.4 Rheumatoide Arthritis (RA)

Auch die RA wird als Autoimmunerkrankung definiert, und sie wird als eine dem SLE und dem Sjögren's Syndrom verwandte Krankheit gesehen (Übersicht in [411]). Genetische Dispositionen konnten bei der RA ebenfalls festgestellt werden: Es sind zum einen mehr Frauen von der RA betroffen als Männer und zum anderen kann das HLA-DRB1*04-Allel bei 65 % der Patienten festgestellt werden [134; 288]. Die Entdeckung, dass Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf oftmals homozygot für dieses Allel sind, führte zu der Hypothese, dass ein bisher unbekanntes Autoantigen hauptsächlich über dieses HLA-Molekül präsentiert wird [413].

Wie für den SLE oder Sjögren's Syndrom wurden auch für die RA (zuletzt sieben) Kriterien definiert, von denen vier für die Diagnose zutreffen müssen. Zu diesen Kriterien gehören neben Schwellungen an den Gelenken und den Händen Veränderungen im Knochenbau, die Manifestation von Rheumaknoten, das Auftreten des sog. Rheumafaktors (Antikörperaggregate) im Blut und andere Beschwerden [17].

Für die Pathogenese der RA hat man eine den bereits beschriebenen Autoimmunerkrankungen ähnliche Vorstellung: Induziert durch einen unbekannten Auslöser respektive Autoantigen(e) werden die Gelenkgewebe der Patienten von Makrophagen, DCs, B-Zellen, Th-Zellen und CD154⁺ CTLs infiltriert. Die Entnahme von Biopsien zeigte darüber hinaus, dass diese Leukozyten Strukturen bilden, die dem Follikel des Lymphknotens ähnlich sind [406; 412]. Die Th-Zellen in der Gelenkflüssigkeit sind anhand ihrer Expression von CD69 oder CD154 als aktiviert beschrieben; diese Expression korreliert teilweise mit dem Verlauf der Krankheit [164; 240]. Desweiteren wird im Vollblut und in der Gelenkflüssigkeit

der RA-Patienten ein erhöhter Anteil CD28⁻ Th-Zellen gemessen [339]. Die Fähigkeit dieser Th-Zellen Perforin zu exprimieren, erhebt den Verdacht, dass sie maßgeblich an der Zerstörung des Gewebes mittels Zelllyse beteiligt sind [274]. Darüber hinaus konnte eine *in vitro* Studie zeigen, dass die Differenzierung von Memory Th-Zellen der RA-Patienten zu Effektor Th-Zellen hauptsächlich zu Th₁-Zellen führt. Damit wurde auch bei der RA ein Übergewicht dieser Th-Zellsubpopulation bestätigt [354]. Mithilfe des adoptiven Transfers von Th-Zellen aus dem Blut der Patienten ins Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Th-Zellen für die Infiltration des Gewebes entscheidend sind. Ein *in vitro* Experiment zeigte weiterhin, dass das Th₁-Zytokin IFN- γ für das Überleben der infiltrierenden Makrophagen eine entscheidende Rolle spielt, womit die chronische Inflammation erklärt werden kann [201]. Eine Unterbrechung dieser ist möglich, indem die Th-Zellen über CD4-Antikörper in ihrer Zahl gesenkt werden. Die Folge dieser Therapie ist eine deutliche Besserung des Krankheitsverlaufs [340; 370].

Die T-Lymphozyten der RA-Patienten sind nicht nur für die chronische Inflammation mitverantwortlich, sondern es konnten auch Veränderungen in ihrer Apoptoseneigung festgestellt werden.

Während die T-Zellen aus dem Vollblut der Patienten infolge einer *in vitro* Reaktion mit Anti-CD95 kaum in Apoptose gehen, zeigen sich die synovialen T-Zellen von einer hohen apoptotischen Empfindlichkeit [146]. Demgegenüber ergab eine Untersuchung von Patienten-Gelenkgewebe einen hohen Anteil apoptotischer Makrophagen, während die T-Zellen aufgrund einer hohen Bcl-2-Expression kaum in Apoptose gehen [106]. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Induktion der Apoptose in den T-Zellen aus dem Gelenkgewebe unter anderem davon abhängt, ob eine Interaktion mit synovialen Fibroblasten stattfindet oder nicht [332]. Offensichtlich ist die Bereitschaft der T-Zellen zur Apoptose von den Rahmenbedingungen abhängig.

1.2 Antigen-spezifische Immunantwort

Die Interaktion von APZs und T-Zellen ist ein wesentlicher Schritt in der Entstehung einer antigen-spezifischen Immunreaktion. Die Aufgabe der APZs liegt darin die verschiedensten Antigene für das Immunsystem erkennbar zu machen, während die aktivierten antigen-spezifischen T-Zellen für die Ausführung und Modulation der Immunantwort zuständig sind.

1.2.1 T-Zellen und ihre Funktion

Damit eine antigen-spezifische Immunantwort entstehen kann, müssen die T-Zellen mit ihrem Rezeptor und die APZs mit ihren speziellen antigen-präsentierenden Molekülen interagieren.

1.2.1.1 T-Zellrezeptor (TCR) von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die Identifizierung des T-Zellrezeptors (TCR) vor 20 Jahren erbrachte ein Heterodimer, das aus α - und β -Ketten besteht, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Darüber hinaus wurde mittels Antikörperinhibition gezeigt, dass der TCR für die antigen-spezifische Funktion wesentlich ist [259]. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte bereits vorher die Epitope CD4 (früher T4) und CD8 (früher T8) als T-Zellmarker und Korezeptoren identifizieren. Dabei wurden CD4⁺ Th-Zellen als reaktiv auf Antigene charakterisiert, die über den Haupthistokompatibilitätskomplex (Major histocompatibility complex: MHC)-II präsentiert werden, während die CD8⁺ CTLs auf Antigene reagieren, die über MHC-I präsentiert werden [260]. In Mäusen konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen relativ konstant bleibt. Selbst eine künstliche Verschiebung dieses Verhältnisses *in vivo* wird bald wieder ausgeglichen [316].

Im TCR sind mehrere Untereinheiten integriert, die den CD3 bilden. Pro TCR konnten jeweils zwei ϵ -Untereinheiten identifiziert werden [44]. Die Anwesenheit von zwei ζ -Untereinheiten pro TCR, die an der Signaltransduktion beteiligt sind und über eine Disulfidbrücke verbunden sind, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [408]. Weitergehende Untersuchungen des TCR mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer und Immunpräzipitation ergaben folgende Stöchiometrie: In einem TCR befinden sich jeweils zwei α/β -Ketten mit einer γ - und einer δ -Untereinheit und jeweils zwei ϵ - und zwei ζ -Untereinheiten [105].

In einer ruhenden T-Zelle ist der TCR zusammen mit anderen Rezeptoren Bestandteil von sog. lipid rafts. Die Zusammensetzung und Stöchiometrie der Rezeptoren in diesen rafts ist nicht unumstritten. Eine Annahme ist, dass sie den TCR und die Korezeptoren CD4 oder CD8 enthalten, die mit der Kinase LCK assoziiert sind [190]. Ein anderes Modell postuliert rafts, die außer dem TCR lediglich das kostimulatorische Molekül CD28 enthalten [177].

1.2.1.2 Interaktionen von Th-Zellen mit Dendritischen Zellen

Die Auswirkungen einer Antigengabe auf die Migration und Entwicklung der beteiligten Leukozyten wurden überwiegend in der Maus verfolgt. Dazu wurden diverse Mausmodelle etabliert, von denen zwei kurz erläutert werden sollen.

KJ-Modell: In der Arbeitsgruppe von M. K. Jenkins et al. wurden transgene Mäuse (DO11.10) generiert, die nur Ovalbumin-spezifische T-Zellen enthalten. Zusätzlich tragen diese auf dem TCR das künstliche Epitop KJ1-26. Nach adoptiven Transfer auf immuntolerante Mäuse (BALB/c) können diese T-Zellen selektiv aktiviert und eindeutig identifiziert werden [196].

PCC-Modell: Eine andere Vorgehensweise ist die Impfung von Mäusen, deren Leukozyten einen speziellen MHC-II exprimieren, mit dem Cytochrom C von Tauben (Pigeon cytochrome C: PCC). Die für dieses Antigen spezifischen T-Zellen sind aufgrund ihrer charakteristischen TCR-Epitope $V_{\alpha}11$ und $V_{\beta}3$ identifizierbar [149; 415].

Ein erster Überblick in die Abfolge einer Immunreaktion gelang in der Arbeit von S. A. Luther et al. Die Antigengabe bewirkt im murinen Lymphknoten nicht nur eine Proliferation der T-Zellen in Assoziation der interdigitierenden DCs sondern auch eine Entwicklung von Keimzentren. Darüber hinaus ist die Differenzierung der B-Zellen nach der Einwanderung der T-Zellen in ihren Bereich von der Antikörperbildung begleitet (siehe **1.2.4** und [237]).

Am KJ-Modell konnte erstmals gezeigt werden, dass Th-Zellen und DCs interagieren. Mittels konfokaler Mikroskopie und unterschiedlicher Anfärbung von DCs und Th-Zellen vor dem Transfer wurde demonstriert, dass die DCs und die Th-Zellen in den Parakortex des Lymphknotens einwandern. Nur die vorherige Auseinandersetzung mit dem Antigen (*in vitro* oder *in vivo*) führte zu einer Interaktion der beiden Zelltypen [168]. Eine neuere Studie mit der gleichen Methodik ergab ohne Antigengabe eine Gleichverteilung und physikalische Interaktionen von Th-Zellen mit $CD8^+$ DCs im Parakortex. Wurde jedoch das

Antigen injiziert, so wanderten die Th-Zellen an den Rand des Parakortex und interagierten mit CD11b⁺ DCs, die das mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugierte Ovalbumin aufgenommen hatten und im MHC-II präsentierten [169].

Die Aufklärung der interagierenden Mechanismen gelang auch auf der Ebene der Zellrezeptoren und -liganden.

Für beide MHC-Moleküle konnte mittels Strukturanalyse gezeigt werden, dass sie mit dem TCR räumlich zusammenpassen [117]. Die beiden Ketten des TCR enthalten jeweils konstante und variable Bereiche, wobei hauptsächlich die variablen Bereiche für die Erkennung des MHC-gebundenen Peptids zuständig sind. Die variablen Bereiche werden in sog. complementarity determining regions (CDRs) eingeteilt, von denen CDR1 und CDR2 den MHC und CDR3 das gebundene Peptid erkennen und gemeinsam die Bindung des TCR an den MHC vollziehen (siehe **1.2.2.2.3** und [118])[326]. Eine Charakterisierung der Bindung erfolgte an mutierten MHC-Molekülen mit verschiedenen Peptiden. Dabei konnte eine erste Assoziation zwischen TCR und MHC ermittelt werden, die unabhängig vom MHC-gebundenen Peptid ist. Erst im zweiten peptidabhängigen Schritt erfolgt eine stabile Bindung des TCR an den MHC [417]. Mittels dreidimensionaler Fluoreszenzmikroskopie konnte diese Bindung sichtbar gemacht werden, und es wurde gezeigt, dass die Th-Zellen teilweise mit hoher Empfindlichkeit reagieren können [171].

Eine Untersuchung an murinen reifenden Langerhans-DCs konnte zeigen, dass diese ein Chemokin, das sog. macrophage-derived chemokine, sezernieren. Dieses funktioniert *in vitro* nur bei aktivierten T-Zellen chemotaktisch, und man schloss daraus, dass dieses Chemokin die Aufgabe hat, nach der ersten Stimulation der antigenspezifischen Th-Zellen über MHC-II/TCR diese erneut anzulocken und weitere Interaktionen zu ermöglichen [375]. Als Chemokine werden kleine Proteine definiert, deren Funktion in der Steuerung der Leukozytenwanderung und -aktivierung besteht. Sie können von Leukozyten selbst oder von interagierenden Geweben ausgeschüttet werden [318].

Der Interaktion von MHC-II und TCR folgt die Aktivierung der Th-Zelle, was in **1.2.5** beschrieben ist. Es wird als wahrscheinlicher gesehen, dass die reifen DCs nach der Antigenpräsentation in Apoptose gehen, da man bisher in efferenten Lymphgefäßen keine DCs nachweisen konnte (siehe **1.4** und [27]).

1.2.2 Dendritische Zellen und ihre Funktion

Zur Generierung von antigenspezifischen T-Zellen ist es nötig, die Fremdanigene für das Immunsystem erkennbar zu machen. Diese Aufgabe erfüllen die APZs, die diese Antigene aufzunehmen, degradieren und sie über bestimmte Moleküle den T-Lymphozyten präsentieren. Alle Körperzellen können zu einer APZ werden, wenngleich DCs und ihre Vorläuferzellen zusätzlich die Fähigkeit besitzen fremde Antigene zu erkennen und aufzunehmen. DCs werden daher als professionelle APZs gesehen und sind sehr potente Induktoren einer antigenspezifischen Immunantwort (Übersicht in [26; 27]).

1.2.2.1 Differenzierung und Migration Dendritischer Zellen

Wie alle Leukozyten entwickeln sich die DCs aus Stammzellen des Knochenmarks, die als DC-Vorläuferzellen im Blut detektiert werden können. Die Auseinandersetzung dieser DC-Vorläuferzellen mit einem Fremdanigen führt bei diesen zu Veränderungen ihres Phänotyps und ihrer Eigenschaften.

1.2.2.1.1 Analyse von Blutvorläuferzellen und Generierung von unreifen Dendritischen Zellen

Die bisherigen Erkenntnisse, die aus Versuchen *in vitro* und der immunologischen Charakterisierung gewonnen werden konnten, identifizieren mindestens vier verschiedene Typen von DC-Vorläuferzellen in Vollblut und in unterschiedlichen Geweben. Die Typisierung dieser Vorläuferzellen erfolgt aufgrund ihrer Oberflächenantigene und der für ihre Differenzierung zu DCs notwendigen Zytokine. In Tab. 1.1 wurde der Versuch unternommen, diese vier unterscheidbaren Populationen an DC-Vorläuferzellen mit ihren wichtigsten Oberflächenmarkern zusammenzustellen. Die Expression wurde dabei in vier Kategorien eingeteilt: Von keiner Expression „-“ bis starker Expression „+++“.

An Patienten mit Autoimmunerkrankungen wurden bisher kaum Veränderungen bezüglich dieser Leukozytenpopulation beschrieben, außer einer erniedrigten Anzahl von CD1⁺ DCs im Vollblut von Patienten mit Sjögren's Syndrom [292].

Antigen	CD14 ⁺⁺⁺	CD1c ⁺⁺	BDCA-2 ⁺⁺ (Typ-II C-Typ Lectin)	BDCA-3 ⁺⁺
CD1c	-	++	-	-
CD11c	++	++	-	+
CD32	-	+	-	-
CD33	++	++	-	+
CD45RA	+	-	+	-
CD62L		+++	++	++
CD64	++	+	-	-
CD86	-	+	+	++
CD116	+	++	+	++
CD123	-	+	++	-
CLA		++	++	+++
HLA-DR	++	++	+	+

Tab. 1.1: Oberflächenantigene von vier DC-Vorläuferzelltypen in Vollblut

Die zahlenmäßig größte Gruppe der DC-Vorläuferzellen stellen die Monozyten dar. Sie sind aber keine einheitliche Leukozytenpopulation, sondern zerfallen in mehrere Gruppen [379]. Im Arbeitskreis durchgeführte Studien konnten insgesamt vier Subpopulationen identifizieren (in Tab. 1.1 wurden die beiden Hauptgruppen unter CD14⁺⁺⁺ zusammengefasst)[324; 368]. Inkubiert man isolierte Monozyten mit GM-CSF und IL-4, so differenzieren sich diese zu DCs, die die charakteristischen Antigene (MHC-II, CD1a, -b, -c, CD40, CD80, usw.) neu oder stärker exprimieren. Darüber hinaus können sie nach Gabe eines Antigens eine antigenspezifische Immunantwort induzieren [305; 329].

Andererseits ist es auch möglich aus Monozyten mittels M-CSF-Inkubation Makrophagen zu generieren, die einen anderen Typ DC-Vorläuferzelle darstellen. Kultiviert man Makrophagen *in vitro* mit GM-CSF und IL-4, differenzieren sich diese zu den oben beschriebenen DCs weiter; diese Entwicklung ist reversibel, solange die DCs unreif sind [294].

Die in Tab. 1.1 mit CD1c⁺⁺ bezeichneten Vorläuferzellen entwickeln sich zu Langerhans-DCs, wenn man sie für einen Tag mit den Zytokinen GM-CSF, IL-4 und TGF- β inkubiert. Mehrere Publikationen der Arbeitsgruppe von T. Ito et al. postulieren diese Langerhans-DCs und ihre Vorläuferzellen als CD1a⁺ aufgrund

ihrer Reaktivität mit dem Antikörperklon BB-5. Jedoch wurde das von BB-5 erkannte Epitop von A. Dzionek et al. als CD1c korrigiert, weshalb man die Vorläuferzellen der Langerhans-DC als negativ für CD1a betrachtet [87; 172; 281]. Ein anderes Protokoll generiert *in vitro* diese Langerhans-DCs direkt aus CD34⁺ hämatopoietischen Stammzellen über eine Kombination von GM-CSF mit TNF- α im Kulturmedium [58]. Die CD1c⁺⁺ Vorläuferzellen können aber auch in Kulturmedien mit M-CSF zu Makrophagen differenzieren, was eine gewisse Flexibilität in der Entstehung von DCs demonstriert [294].

Der dritte Typ der BDCA-2⁺⁺ Vorläuferzellen wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander in Lymphgeweben gefunden. Für ihre Kultivierung und Differenzierung zu unreifen DCs ist das Zytokin IL-3 essentiell, dessen Rezeptor sie exprimieren (CD123 ist die α -Kette des IL-3-Rezeptors) [138; 289]. Die Zellen konnten vor der Beschreibung des Antigens BDCA-2 auch in Vollblut identifiziert und charakterisiert werden [359; 368]. Eine sehr umfangreiche Charakterisierung erbrachte zuerst neben den Monozyten nur zwei DC-Vorläuferpopulationen im Vollblut. Neben einer Gesamtfrequenz von etwa 16 Zellen pro μ l Vollblut wurde nur bei einer der beiden Populationen eine Zytokinsekretion infolge Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) gefunden [7]. Die Entdeckung der drei Antigene BDCA-2 bis BDCA-4 erweiterte die Anzahl der Populationen auf mindestens vier, da BDCA-2 und BDCA-4 auf den gleichen Zellen exprimiert wird [87]. Zwei nachfolgende Arbeiten identifizierten BDCA-2 als Typ-II C-Typ Lektin, dessen Internalisierung nach Antikörperbindung die Produktion von IFN- α und - β der DCs inhibiert [89]. Das auf den gleichen DCs exprimierte Antigen BDCA-4 wurde als identisch zu Neuropilin-1, einem Neuronalrezeptor, ermittelt [88].

Die BDCA-3⁺⁺ DC-Vorläuferzellen wurden bisher nur phänotypisch aber nicht funktionell charakterisiert.

Auch aus Mäusen wurden mehrere Typen von DCs isoliert. Dabei wurde gefunden, dass murine DCs und T-Zellen dieselbe Vorläuferzelle haben. Die DCs exprimieren MHC-II und im Gegensatz zu humanen DCs CD8 α [405]. Weiterführende Arbeiten konnten insgesamt drei Populationen an DCs nachweisen, die sich in CD8 α ⁻/DEC-205⁻, CD8 α ⁺/DEC-205⁺ und CD8 α ⁻/DEC-205⁺ mit unterschiedlicher Expression von CD11b aufspalten. Diese sind jedoch durchweg für Antigene positiv, die auf humanen DCs unterschiedlich stark exprimiert werden (z. B. CD11c, CD40, CD86, etc.) [357; 404].

1.2.2.1.2 Reifung der Dendritischen Zellen

Die Internalisierung von Antigenen (siehe 1.2.2.2.1) führt neben ihrer Prozessierung zur Aktivierung und Reifung der DCs. Diese Reifung hat tiefgreifende Veränderungen zur Folge und ist unumkehrbar.

Die Induktion der DC-Reifung kann auch künstlich erfolgen, indem beispielsweise bakterielle Produkte wie LPS zugegeben werden. Die Folgen sind unter anderem eine herabgesetzte Expression bestimmter Rezeptoren, begleitet von einer verminderten Phagozytosefähigkeit [313; 328]. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass entweder das Zytokin TNF- α oder ein löslicher Ligand von CD40 unreife DCs reifen lässt, mit der Folge einer gesteigerten Fähigkeit zur Stimulation von T-Zellen [329]. Darüber hinaus konnte in einem anderen Ansatz die Reifung der DCs mit den Zytokinen IL-1 β und IL-6 in Kombination mit Prostaglandin E2 induziert werden [183].

Die Reifung führt ebenfalls zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Aus runden unreifen DCs werden sternförmige reife DCs.

Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Morphologie reifender muriner Langerhans-DCs von der Expression des Proteins Fascin abhängt. Wird die Transkription von Fascin unterbunden, so werden keine charakteristischen Zellfortsätze ausgebildet [322]. In einer Folgearbeit konnten diese Ergebnisse an humanen DCs, die aus Monozyten generiert worden waren, reproduziert werden. Außerdem konnte eine Korelation zwischen Fascin und dem Reifemarker CD83 nachgewiesen werden [321]. Weiterhin wurde an murinen DCs gezeigt, dass ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren von der Expression des Fascins abhängig ist [3].

Infolge ihrer Reifung exprimieren DCs bei Mensch und Maus bestimmte Moleküle an der Oberfläche. Neben einer höheren Expression von MHC-II werden auch Reifemarker und kostimulatorische Rezeptoren hochreguliert. Diese Korezeptoren können *per se* die T-Zellen nicht stimulieren, verstärken aber die Aktivierung der T-Zellen nach der Interaktion von MHC-II und TCR.

Auch das Beta-Integrin CD11c wurde als DC-Reifemarker identifiziert. Mit der direkten Isolation von CD11c⁺ DCs aus Vollblut wurden Zellen gewonnen, die T-Zellen stimulieren können. Allerdings ist es zweifelhaft, dass das angewandte Protokoll eine Reifung der DCs infolge einer Verunreinigung ausschließt [280].

Das Antigen CD80 (vorher BB-1 oder B7-1) wurde anfangs auf aktivierten B-Zellen identifiziert [421]. Die Klonierung ergab ein 262 Aminosäuren

umfassendes Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie mit zwei extrazellulären (44/54 kDa) Domänen [111]. Die Adhäsion von Zellen, die CD28 fremdexprimieren, an CD80⁺ B-Zellen und die Inhibition dieser Adhäsion mittels Antikörper gegen CD80 demonstrierte die Interaktion dieser beiden Oberflächenantigene [228]. Nachfolgende Studien konnten zeigen, dass diese Interaktion von CD80⁺ B-Zellen eine kostimulierende Wirkung auf CD28⁺ T-Zellen hat [226]. Und es wurde entdeckt, dass CD80 auch mit dem zu CD28 homologen CD152 interagieren kann [227].

Mit CD86 (vorher B7-2) wurde ein weiteres Antigen gefunden, das wie CD80 mit CD152 und CD28 interagiert [219]. Die Klonierung des Gens erbrachte nur eine Identität von 26 % mit CD80, jedoch sind sich die Strukturen der Proteine CD80 und CD86 sehr ähnlich [112]. Die weiteren Konsequenzen einer Interaktion mit CD28 und CD152 und die Funktionen dieser T-Zellkorezeptoren sind in **1.2.5.3** beschrieben.

1.2.2.1.3 Migration der Dendritischen Zellen in das Gewebe

Die Annahme ist, dass die in **1.2.2.1.1** beschriebenen DC-Vorläuferzellen aus Stammzellen des Knochenmarks entstehen, in den Blutkreislauf eintreten und von dort in die jeweiligen Gewebe einwandern.

An Ratten konnte gezeigt werden, dass nach der Inhalation diverser Pathogene ein schneller Anstieg der DC-Zellzahlen im Lungenepithelgewebe erfolgt. Die aus dem Epithel isolierten DCs reagieren außerdem auf diverse Chemokine [256].

An *in vitro* generierten Langerhans-DCs konnte gezeigt werden, dass sie je nach Entwicklungsstufe im unreifen Zustand den Chemokinrezeptor 6 (CCR6) und im reifen Zustand CCR7 exprimieren. Dies geht mit einer Reaktivität gegenüber den jeweiligen Chemokinen Makrophagen inflammatorisches Protein-3 α (MIP-3 α für CCR6) und MIP-3 β (für CCR7) einher. Diese Resultate konnten an aus Monozyten generierten DCs und Vollblut-DCs reproduziert werden. Außerdem konnte die Expression von MIP-3 α oder β in diversen Geweben (Haut, Tonsillen) nachgewiesen werden [83].

In Mäusen wurde das Antigen E-Cadherin als wichtig für die Bindung der Langerhans-DCs an Keratinozyten identifiziert. E-Cadherin wird von den unreifen Zellen sehr stark exprimiert und infolge der Reifung herunterreguliert was eine schwächere Affinität zu den Keratinozyten bewirkt [374]. Die künstliche

Induktion der Reifung in den Langerhans-DCs führt zu deren Abspaltung von den Keratinozyten [176].

1.2.2.2 Funktion Dendritischer Zellen

Bevor DCs ihre Aufgabe als APZs für T-Zellen erfüllen können, müssen sie nicht nur Antigene erkennen, sondern diese auch aufnehmen, degradieren und in spezielle Moleküle einbauen. Die Exposition dieser beladenen Moleküle ermöglicht die in **1.2.1.2** beschriebene Interaktion zwischen T-Zellen und DCs.

1.2.2.2.1 Aufnahme von Antigenen durch die Dendritischen Zellen

An unreifen DCs konnten mehrere Mechanismen beobachtet werden, um verschiedene Antigene aufzunehmen. Man geht davon aus, dass dies hauptsächlich in den Geweben geschieht, in die die DC-Vorläuferzellen bzw. die unreifen DCs vorher eingewandert sind.

An humanen DCs, die über GM-CSF/IL-4 aus Monozyten generiert wurden, konnte die Aufnahme des Antigens über Makropinozytose einerseits und über einen Mannoserezeptor andererseits nachgewiesen werden [328]. Demgegenüber konnte auf Langerhans-DCs kein funktioneller Mannoserezeptor nachgewiesen werden. Außerdem ist deren Fähigkeit zur Endozytose vergleichsweise gering [262].

Eine weitere Möglichkeit zur Aufnahme ergibt sich für unreife humane DCs über die Expression von Fc γ -Rezeptoren. Von den drei bekannten Typen CD16 (Fc γ RIII), CD32 (Fc γ RII) und CD64 (Fc γ RI) exprimieren die Vorläuferzellen der Langerhans-DCs CD32 und CD64, während unreife DCs aus Monozyten nur CD64⁺ sind. Diese IgG-Rezeptoren ermöglichen den Zellen Antigene aufzunehmen, die vorher von Antikörpern dekoriert worden sind [102]. Ein weiterer Rezeptor der unreifen Monozyten-DCs ist der Scavenger-Rezeptor CD36. Zusammen mit dem Integrin $\alpha_v\beta_5$ ist er für die Aufnahme apoptotischer Zellen verantwortlich [4].

Schließlich konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass unreife DCs auch das Hitzeschockprotein Hsp70 mit gebundenen Peptiden aufnehmen können [386].

1.2.2.2.2 Antigenprozessierung im MHC-I-System

Im Anschluss an die Antigenaufnahme erfolgt die Prozessierung, die zum Ziel hat, das Antigen für das Immunsystem erkennbar zu machen. Während die

Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort über die Moleküle des MHC-II oder CD1a bis CD1d nur bestimmten Zelltypen möglich ist, werden die Moleküle des MHC-I von allen Körperzellen exprimiert. Die Hauptaufgabe dieses MHC-Systems wird in der Präsentation viraler Antigene gesehen.

Die Strukturanalyse des extrazellulären Teils des humanen MHC-I erbrachte eine α -Polypeptidkette, die aus drei Domänen besteht von denen α_1 und α_2 eine Tasche bilden [42]. Weiterhin wurde gezeigt, dass in dieser Tasche virale Peptide gebunden werden können, und der MHC-I mit dem β_2 -Mikroglobulin assoziiert [389]. Eine Folgearbeit konnte beweisen, dass die Bindung kleiner Peptide (9 – 10 Aminosäuren) in den MHC-I diesen stabilisiert und die Assoziation von β_2 -Mikroglobulin begünstigt [92]. Die Untersuchung der Bindungstasche ergab eine Raumstruktur, die polymorph ist und eine spezifische Bindung kurzer Peptide zulässt [252].

Das MHC-I-System setzt sich aus den drei Molekülen HLA-A, HLA-B und HLA-C zusammen. An den HLA-Molekülen können einerseits über monoklonale Antikörper viele Epitope identifiziert werden, die wegen ihrer hohen Polymorphismenrate zur Bestimmung einer möglichen Transplantationsunverträglichkeit untersucht werden. Andererseits werden die Untersuchungen auf die Charakterisierung der codierenden Gene ausgeweitet und damit die Typisierung kontinuierlich präzisiert [248].

Infolge einer viralen Infektion kommt es in den infizierten Zellen zur Expression viraler Proteine und viralem Erbgut. Die viralen Proteine können von speziellen zytosolischen Enzymen erkannt und mit Ubiquitin konjugiert werden. Die ubiquitinierten Proteine werden daraufhin von zytosolischen Proteasen und vom sog. Proteasom degradiert, das einen Multienzymkomplex darstellt. Die Expression einiger seiner Untereinheiten kann durch das Zytokin IFN- γ induziert werden. Die degradierten viralen Peptide werden in das ER transloziert. Dies vollzieht der TAP-Transporter mit seinen beiden Untereinheiten ABCB2 und ABCB3 (Übersicht in [295]).

Im ER erfolgt die Beladung des MHC-I mit den viralen Peptiden im sog. peptide loading complex. Dieser besteht aus 4 MHC-I/ β_2 -Mikroglobulin Dimeren, einem ABCB2/ABCB3 Dimer und anderen Proteinen und Faltungshelfern. Die Annahme ist, dass der MHC-I mithilfe der Faltungshelfer im ER gefaltet wird, das β_2 -Mikroglobulin assoziiert und sich mit den anderen Proteinen der peptide loading complex bilden kann. Über das ABCB2/ABCB3 Dimer wird der MHC-I mit Peptid

beladen und in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert (Ausführlich erläutert in [414]). Dort wird das präsentierte Peptid von antigenspezifischen CTLs erkannt, die über CD95L oder Perforin/Granzyme in der befallenen Zelle die Apoptose induzieren (siehe **1.4.3**).

1.2.2.2.3 Antigenprozessierung im MHC-II-System

Das MHC-II-System grenzt sich vom MHC-I-System dadurch ab, dass es nur bestimmte Leukozyten wie B-Zellen, DCs oder Makrophagen besitzen. Seine Zuständigkeit liegt in der Präsentation exogener viraler und bakterieller Peptide, die vorher internalisiert und degradiert werden müssen. Dagegen präsentiert das MHC-I-System einer virusbefallenen Zelle vorwiegend endogene Antigene, die die umprogrammierte Zelle selbst exprimiert.

Das MHC-II-Molekül besteht aus zwei transmembranen Polypeptidketten α und β , die auf der extrazellulären Seite eine offene Tasche ausbilden [50]. In dieser Tasche kann ein Peptid aus 15 – 20 Aminosäuren gebunden werden [61; 325]. Im MHC-II-System werden mehrere Gruppen unterschieden, von denen die HLA-DR, -DQ und -DP-Moleküle die wichtigsten sind. Wie beim MHC-I-System ist eine serologische und genetische Typisierung im Fall einer Transplantation unverzichtbar [248].

Die über Phagozytose aufgenommenen Antigene (Bakterien, Peptide, usw.) gelangen in den DCs zu Kompartimenten, die reich an MHC-II sind. Diese Kompartimente enthalten das HLA-DM Molekül, an dem die sog. invariant chain gebunden hat [277]. Die invariant chain und das Antigen werden im Kompartiment proteolytisch gespalten; danach erfolgt die Bindung der Antigenfragmente an die MHC-II-Moleküle [57]. An murinen DCs konnte auch gezeigt werden, dass die degradierten Peptide erst dann in den MHC-II eingebaut werden, wenn die DCs infolge Zytokin- oder LPS-Gabe mit der Reifung begonnen haben. Die Annahme ist, dass auf diese Weise eine Steuerung der nachfolgenden Aktivierung der Th-Zellen möglich wird [167].

Der Transport der degradierten Antigene an die Zelloberfläche erfolgt in nicht lysosomalen Vesikeln, die sowohl MHC-I und MHC-II als auch CD80 und CD86 enthalten. Nach der Fusion der Vesikel mit der Zytoplasmamembran können diese Moleküle als Cluster nachgewiesen werden [394]. Eine Studie konnte zeigen, dass die unbeladenen MHC-II-Moleküle bereits mit einer Halbwertszeit von 10 h wieder internalisiert werden. Dagegen führt die Stimulation der

humanen DCs mit Tetanustoxoid (TT) zur Erhöhung dieser Halbwertszeit auf 100 h und zu einer verstärkten Expression dieser Moleküle [60]. Eine andere Studie ergab für murine DCs ähnliche Ergebnisse [306].

1.2.2.2.4 Antigenprozessierung im CD1-System

Das CD1-System konnte wie das MHC-II-System nur in bestimmten Leukozytenpopulationen (DCs, B-Zellen, usw.) identifiziert werden. Es ist für die Präsentation lipophiler Antigene zuständig.

Beim Menschen wurden bisher fünf verschiedene CD1-Molekültypen von CD1a bis CD1e kloniert und beschrieben. Dabei wurden CD1a bis CD1c aufgrund ihrer Homologien zueinander in einer Gruppe zusammengefasst, so dass man insgesamt drei Gruppen unterscheidet [53]. Demgegenüber wurde im murinen Organismus nur das Molekül CD1d nachgewiesen [48].

Die Charakterisierung des murinen CD1d-Molekül mittels Sequenzierung und Röntgenstrukturanalyse erbrachte ein Transmembranprotein, dessen extrazellulärer Anteil eine dreiteilige α -Kette beinhaltet, die das β_2 -Mikroglobulin assoziiert. Die von den Domänen α_1 und α_2 gebildete tiefe und schmale Tasche ist wegen der hydrophoben Aminosäuren von lipophiler Natur und erscheint zur Bindung langer Fettsäuren gut geeignet. Aufgrund seiner Raumstruktur und der Assoziation von β_2 -Mikroglobulin wird CD1d als mit MHC-I verwandt gesehen [425]. Eine neuere Strukturanalyse des humanen CD1b-Molekül erbrachte dem murinen CD1d ähnliche Ergebnisse und zeigt für die Bindungstasche einen Aufbau, der es CD1b möglich macht, Lipide unterschiedlicher Größe zu binden [116].

Für die Moleküle CD1a bis CD1d konnte allgemein gezeigt werden, dass sie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) nach ihrer Synthese mit β_2 -Mikroglobulin assoziieren und unbeladen in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert werden. Dort werden sie exponiert und anschließend internalisiert. Nach der Reinternalisierung fusionieren die CD1-enthaltenden Vesikel mit den Endosomen oder Lysosomen und die CD1-Moleküle werden mit lipophilen Antigenen beladen. Die beladenen CD1-Moleküle gelangen wieder in Vesikeln an die Zelloberfläche, wo sie die Antigene präsentieren. Die Adapter Proteine AP-2 und teilweise AP-3 fungieren dabei als Mediatoren (zusammengefasst in [85]).

CD1a

Das Molekül CD1a konnte mangels Bekanntheit eines präsentierten Lipids bisher nicht weitergehend charakterisiert werden [364].

CD1b

Demgegenüber wurden beim CD1b-Molekül eine ganze Palette an präsentierten Antigenen identifiziert. Eine erste Studie konnte mittels isolierter Mycolsäure eine Präsentation und Stimulation von T-Zellen zeigen [31]. Eine Folgearbeit identifizierte als weiteres Antigen das Lipoglykan Lipoarabinomannan, das nach seiner Internalisierung über CD1b präsentiert wird und T-Zellen stimulieren kann [352]. Die Verfolgung der Antigenprozessierung von Lipoarabinomannan im Makrophagen ergab, dass das Lipid zuerst über den Mannoserezeptor aufgenommen wird. Danach wird es zu späten Endosomen, Lysosomen und MHC-II enthaltenden Kompartimenten transportiert und in CD1b integriert. Das beladene CD1b gelangt an die Zelloberfläche und präsentiert das Lipid [309]. Eine weitere Untersuchung ergab, dass diese Präsentation eine Ansäuerung des CD1b-Moleküls voraussetzt [364]. Darüber hinaus hängt die Präsentation der Antigene durch CD1b von AP-3 ab. Dies konnte an DCs gezeigt werden, die aus dem Blut von Patienten mit Hermansky-Pudlak Syndrom generiert wurden. Diese Patienten haben eine Mutation im *AP-3 β3A* Gen, und der funktionslose AP-3-Proteinkomplex kann nicht an CD1b binden, was die Fusion der Vesikel mit den Lysosomen verhindert [363]. Eine neue Studie ermittelte über radioaktive Lipidmarkierung und Stimulation, dass die Präsentation kurzer Alkylgruppen (C_{32}) durch unprofessionelle APZs (z. B. Thymozyten) relativ schnell und ohne Internalisierung erfolgen kann. Lange Alkylgruppen (C_{80}) hingegen werden von professionellen DCs präsentiert, was jedoch den intrazellulären Transport zu den Endosomen voraussetzt und mehr Zeit benötigt [265].

CD1c

Mit β 1-Mannosylphosphoisoprenoid konnte eine Studie mittels CD1-inhibierende Antikörper und Massenspektroskopie zumindest ein Lipid identifizieren, das über CD1c präsentiert wird [266]. Zwei weitere Arbeiten konnten mit Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie unabhängig voneinander zeigen, dass CD1c enthaltende Vesikel bereits mit den frühen Endosomen fusionieren. Die funktionelle Präsentation des Lipids über CD1c ist unabhängig von einer vorhergehenden Ansäuerung [49; 365].

CD1d

Während CD1a bis CD1c nur im Menschen gefunden wurden, konnte man CD1d in Mensch und Maus nachweisen. Im Gegensatz zum Menschen wurden bei den Mäusen zwei Gene (*CD1D1* und *CD1D2*) beschrieben, die für das CD1d-Molekül codieren [25]. Das erste identifizierte von CD1d-präsentierte Lipid ist α -Galactosylceramid. Dieses Antigen wird aus marinen Schwämmen isoliert und ist im Mausmodell ein starker Stimulus für sog. NK-T-Zellen (siehe **1.2.3**) [195]. Eine nachfolgende Studie an humanen DCs und NK-T-Zellklonen erbrachte identische Ergebnisse [355]. Desweiteren wurden murine NK-T-Zellklone beschrieben, die von drei verschiedenen über CD1d präsentierte Phospholipide stimuliert werden können [140]. Die Untersuchung der intrazellulären Prozessierung im Mausmodell ergab für CD1d zwei unterschiedliche Wege: Der eine ist dem des CD1b-Moleküls ähnlich (siehe oben). Der zweite Weg besteht in der Assoziation von CD1d mit der invariant chain im ER und dem direkten Transport zum Endosom [179]. Die weitergehenden Untersuchungen dieses zweiten Weges an DCs und CD1d-fremdexprimierenden HeLa-Zellen ergaben auch eine Assoziation von CD1d mit MHC-II an der Oberfläche und in den Endosomen [192]. Desweiteren ist es möglich NK-T-Zellen *in vitro* mit rekombinant hergestellten murinen oder humanen CD1d-Molekülen zu stimulieren. Die Bindung von CD1d und den Lipiden kann ohne vorherige Ansäuerung erfolgen [271]. Die Bedeutung des CD1d-Systems konnte in der CD1d-KO-Maus gezeigt werden. Die Abwehr des Spirochäts *Borrelia burgdorferi* ist in diesen Mäusen deutlich behindert [210]. Eine weitere Studie mit *Pseudomonas aeruginosa* an diesen CD1d-KO-Mäusen identifizierte die Ursache als Mangel an CD1d-reaktiven NK-T-Zellen, da eine Stimulation mit α -Galactosylceramid kompensatorisch wirkt [276].

CD1e

In humanen DCs konnten mehrere Formen des CD1e-Moleküls nachgewiesen und mittels Transfektion in HeLa-Zellen eingehender untersucht werden. Die Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin findet im ER statt. CD1e gelangt jedoch nicht an die Zelloberfläche, sondern wird direkt zu den Endosomen transportiert. Eine Beteiligung dieses Moleküls an der Antigenpräsentation konnte bisher nicht gezeigt werden [14].

1.2.3 CD1-restringierte T-Zellen

Die Identifizierung humaner CD1b und CD1c-reaktiver T-Zellen gelang vor allem bei Patienten, die von einer bakteriellen Infektion betroffen waren. Diese T-Zellen erwiesen sich bei ihrer Charakterisierung als Vertreter verschiedener Subpopulationen.

Aus HIV-Patienten, die zusätzlich an Tuberkulose erkrankt waren, konnten T-Zelllinien mit dem α/β TCR isoliert werden, die als CD1b-reaktiv charakterisiert wurden. Außerdem haben sie zytotoxische Eigenschaften und sind sog. doppel-negative T-Zellen, was bedeutet, dass sie weder CD4 noch CD8 exprimieren [123]. Demgegenüber konnten aus reinen Tuberkulosepatienten T-Zelllinien isoliert werden, die als CD8⁺ CTLs charakterisiert wurden und CD1c-reaktiv sind [266]. Auch innerhalb der größten doppelnegativen T-Zellpopulation, den sog. γ/δ T-Zellen (CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻) konnten CD1c-reaktive Linien aus dem Vollblut von Patienten mit Immundefizienz isoliert werden [104].

Demgegenüber konnten CD1d-reaktive T-Zelllinien bei Menschen und Mäusen isoliert werden. Zuerst wurden diese Linien aus Mäusen isoliert, und als doppel-negative T-Zellen charakterisiert, die auf ihrem TCR die Epitope V α 14 und V β 8 tragen. Da sie außerdem NK1⁺ sind, nennt man sie NK-T-Zellen [37]. Die Identifizierung dieser NK-T-Zellen erbrachte beim Menschen CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ T-Zellen mit den TCR-Epitopen V α 24 und V β 11 [98]. Ein weiteres Charakteristikum der humanen und murinen NK-T-Zellen ist ihre Fähigkeit nach einer Stimulation große Mengen Zytokine schnell zu sezernieren [51; 353]. Sowohl in Mäusen als auch beim Menschen konnten jedoch CD1d-reaktive T-Zellen charakterisiert werden, die keine NK-T-Zellen sind. Somit zeigt sich auch bei den CD1d-reaktiven T-Zellen eine gewisse Variabilität, wie sie bereits von CD1b und CD1c bekannt ist [63; 115].

Eine Studie konnte im Vollblut von Autoimmunpatienten ebenfalls NK-T-Zellen nachweisen. Sie sind im Vergleich mit den NK-T-Zellen gesunder Probanden von geringerer Frequenz, und sie sind im Gegensatz zu den Kontrollpersonen nicht bei jedem Patienten mit α -Galactosylceramid stimulierbar [203].

1.2.4 Aufbau und Funktion des sekundären Lymphgewebes

Als primäre lymphatische Organe werden beim Menschen das Knochenmark und der Thymus definiert. Im Knochenmark erfolgt unter anderem die Bildung und Vordifferenzierung von T- und B-Zellen aus hämatopoietischen Stammzellen. Während für die B-Zellen das Knochenmark und die Leber als Orte der weiteren Differenzierung gesehen werden, ist dies für die T-Zellen der Thymus.

Die wichtigsten sekundären lymphatischen Organe sind die Milz, die Lymphknoten und die Peyer plaques, die im folgenden kurz beschrieben werden sollen [317]:

Die Milz besitzt neben der roten die weiße Pulpa, in der spezielle Regionen definiert werden, die sog. periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS).

Die wesentlich kleineren und in großer Zahl vorhandenen Lymphknoten wurden im gesamten Körper verteilt gefunden. In und aus dem Lymphknoten führen afferente respektive efferente Lymphgefäße, die mit Lymphe gefüllt sind und blind enden. Der Lymphknoten kann grob in drei Schichten aufgeteilt werden: Eine Außenschicht (Kortex) mit Follikeln, eine mittlere Schicht (Parakortex) und die innerste Schicht (Medulla). Über Venolen mit hohem Endothel (High endothelial venules: HEV) stehen die Lymphknoten mit dem Blutkreislauf in Verbindung.

Der dritte Teil des sekundären Lymphsystems sind die Peyer plaques, die in der Darmwand lokalisiert sind.

Als wichtigste Aufgabe der sekundären Lymphgewebe wird die Ermöglichung einer Interaktion von DCs, Th-Zellen und B-Zellen gesehen. Damit dies geschehen kann, müssen diese Zellen vorher in das Gewebe gelangen.

1.2.4.1 Einwanderung der Leukozyten in das sekundäre Lymphgewebe

Die beginnende Reifung von humanen und murinen DCs führt dahingehend zu einer Veränderung im Expressionsprofil der Chemokinrezeptoren, dass sie CCR1, CCR5 und CCR6 herunterregulieren. Wie bereits beschrieben können die unreifen DCs mit CCR6 an den Liganden MIP-3 α binden, der von vielen Gewebezellen exprimiert wird (siehe **1.2.2.1.3**). Den reifenden CCR6⁻ DCs ist es auf diese Weise möglich sich aus dem Gewebe zu lösen. Die Hochregulation von CCR7 stellt ihnen einen anderen Rezeptor zur Verfügung, der sie entlang eines Chemokingradienten führen kann [83; 331].

In einer Studie wurde an Mäusen gezeigt, dass das sekundäre Lymphgewebe Chemokin (SLC) sowohl im lymphatischen Endothel als auch im Parakortex des Lymphknotens und in den PALS der Milz exprimiert wird [142]. Weiterhin konnte an murinen DCs demonstriert werden, dass sie auf SLC über CCR7 chemotaktisch reagieren [327]. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die DCs bei Mensch und Maus mithilfe von CCR7 aus den Geweben in die afferenten Lymphgefäße wandern. Über diese immigrieren sie in die sekundären Lymphgewebe [110; 208; 214]. Die Einwanderung reifender DCs einzig über afferente Lymphgefäße ist nicht unumstritten, da im humanen Vollblut auch DCs mit exprimierten Reifemarkern gefunden werden konnten [87].

Für die Immigration der beiden anderen wichtigen Leukozytentypen in die sekundären Lymphgewebe existiert ein Modell, das nachfolgend am Beispiel der Einwanderung der Th-Zellen in den Lymphknoten grob dargestellt werden soll (Übersicht in [52; 54; 71]).

Gelangen die naiven $CD4^+$ Th-Zellen über den Blutkreislauf in die HEVs des Lymphknotens, so können sie über den Rezeptor CD62L (L-Selectin) an den dort exprimierten Liganden GlyCAM andocken. Nach einer erfolgten Aktivierung und der Expression aktivierungsabhängiger Rezeptoren wie LFA-1 kommt es zu einem kurzen Verweilen der Th-Zelle auf dem Endothel, das den entsprechenden Liganden ICAM-1 tragen kann [29]. Danach zwingen sich die Th-Zellen durch das Endothel und können in den Parakortex einwandern. Das von den HEVs und im Parakortex exprimierte Chemokin SLC hat dabei eine chemotaktische Wirkung auf die $CCR7^+$ naiven Th-Zellen [142].

1.2.4.2 Verteilung der Leukozyten im sekundären Lymphgewebe

Nach einer erfolgreichen Einwanderung kommt es in den sekundären Lymphgeweben zu einer Ungleichverteilung der Leukozyten, die von den Chemokinen respektive Liganden und ihren Rezeptoren verursacht werden.

Die Th-Zellen und mit ihnen die interdigitierenden DCs werden hauptsächlich im Parakortex des Lymphknotens, in den PALS der Milz und in den T-Zellarealen der Peyer plaques gefunden. Die Expression von CCR7 durch die Leukozyten und die von SLC oder MIP-3 β durch die Endothelzellen sind dafür die Ursache [71]. Die B-Lymphozyten können dagegen nur in den Follikeln des Lymphknotenkor-tex nachgewiesen werden, und sind damit von den Th-Zellen und den DCs räumlich

getrennt. Mit ihrem Chemokinrezeptor CXCR5 haften sie sich an den dort exprimierten Liganden BLC (früher BLR1) [107].

Die Generierung von KO-Mäusen, denen das Gen für BLC, CXCR5, SLC oder CCR7 zerstört wurde, ermöglichen einen Einblick in die koordinierende Funktion dieser Rezeptoren respektive Liganden.

Die Zerstörung des Gens für BLC führte dabei zu transgenen Mäusen, bei denen die Migration der B- und T-Lymphozyten in und innerhalb der sekundären Lymphgewebe gestört ist [108]. Die Disruption des BLC-Rezeptors CXCR5 erbrachte ähnliche Ergebnisse [275]. Wurde den Mäusen das Gen für SLC zerstört, wurde damit ebenfalls die Einwanderung der naiven Th-Zellen und der DCs in das sekundäre Lymphgewebe unterbunden [141]. Diese Befunde wurden auch bei der Zerstörung des CCR7-Gens erhalten. Dazu kommt bei diesen KO-Mäusen eine stark verzögerte Immunantwort als Folge der unterbundenen Migration von Th-Zellen und DCs [109].

1.2.5 Aktivierung von T-Zellen und ihre Detektion

Nach der in **1.2.1.2** beschriebenen Interaktion zwischen TCR und MHC erfolgt die antigenspezifische Aktivierung der T-Zelle. Diese Aktivierung hat für die T-Zelle weitreichende Folgen und führt zu Veränderungen, die es ermöglichen mittels verschiedener Methodiken aktivierte und ruhende T-Zellen zu unterscheiden.

1.2.5.1 T-Zellaktivierung

Die Signaltransduktion über den TCR und kostimulatorischer Moleküle führt zur T-Zellaktivierung und zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der lipid rafts.

Wie bereits erwähnt, ist die genaue Zusammensetzung der Rezeptoren der lipid rafts unklar. Die Anwesenheit von CD4 respektive CD8 im raft ist relativ unumstritten, ebenso wie die Abwesenheit von CD45. Das Antigen CD28 wird höchstens am Rand des rafts für möglich erachtet [177; 190]. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich mehrere lipid rafts bei Th-Zellen mit dem Antigen CD11a zu sog. Supramolekularen Aktivierungs-Clustern assoziieren [263]. Diese Cluster konnten bei CTLs ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings ist bei diesen die Phosphokinase C mit assoziiert und der Korezeptor CD8 für das Clustering notwendig [308]. Andere Autoren bezeichnen die Aktivierungs-Cluster als Immunsynapsen.

Man geht davon aus, dass die Bildung dieser Cluster zur Steigerung der Sensitivität dienen. Eine Studie fand zwei räumlich und zeitlich getrennte Phasen bei der Formation der Supramolekularen Aktivierungs Cluster. Die zeitliche Trennung erfolgt dabei durch eine kurze Phase der Inaktivität, die von CD45 verursacht wird [113].

Auch das Antigen CD45 ist - wenngleich nicht in den lipid rafts lokalisiert - an der Aktivierung der T-Zellen beteiligt. CD45 ist auf allen Leukozyten exprimiert und wurde als Protein-Tyrosin Phosphatase charakterisiert [387]. Wenn CD45 funktionslos ist, führt dies bei Mensch und Maus zu Leukozyten, die auf keinen Stimulus reagieren können. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass CD45 an der Herunterregulierung der aktivierten Leukozyten beteiligt ist [6; 150]. Für CD45 wurden mehrere Isoformen entdeckt, deren Ursache und Bedeutung in **1.3.1** erläutert sind.

Den Interaktionen der Rezeptoren folgt eine Kaskade verschiedener Kinasen, die über Transkriptionsfaktoren in die Expression und Sekretion unterschiedlicher Proteine mündet.

1.2.5.2 Methoden zur Detektion aktivierter T-Zellen

Zur Identifizierung aktivierter T-Zellen in Vollblut oder nach Separation dieser in Zellkultur sind mehrere Protokolle etabliert, die hauptsächlich die zellulären Veränderungen infolge der Aktivierung identifizieren. Für eine beabsichtigte Routineuntersuchung sollten Methodiken verwendet werden, die schnell und einfach durchzuführen sind.

Die Detektion einer Aktivierung infolge einer Stimulation über den Einbau von radioaktiven Thymidin in die DNA proliferierender Leukozyten respektive T-Zellen ergibt erst nach mehreren Tagen ein Signal im Szintillationszähler. Deswegen und aufgrund der Notwendigkeit von radioaktiven Substanzen, die umständlich zu handhaben sind, ist dieses Protokoll ungeeignet [76].

Auch die Messung der aktivierungsinduzierten Proliferation oder Zellteilung im DFZ über die Färbung von RNA oder DNA verwendet Protokolle, die zu unempfindlich und zu aufwendig sind [13].

Die Bestimmung der Zytokinsekretion mit dem ELISPOT-Assay ist dagegen sehr empfindlich [72]. Dennoch benötigt das Protokoll viele Arbeitsschritte und die mikroskopische Auswertung der Experimente ist zeitaufwendig und mühsam.

Ähnliches gilt für eine Methode zur Identifizierung zytokinsezernierender Zellen im DFZ über bispezifische Antikörper: Die notwendige Separation der PBLs und verschiedene Inkubationsschritte erschweren eine Anwendung innerhalb einer Reihenuntersuchung [246].

Einfacher und schneller sind hingegen die sog. MHC-Tetrameren. Diese rekombinant hergestellten MHC-I- oder MHC-II-Moleküle können mit bekannten Peptiden beladen werden und binden an den TCR der antigenspezifischen T-Zellen [10]. Eine Kopplung der MHC-Moleküle zu Tetrameren und dieser mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Anwendung analog einem monoklonalen Antikörper. Allerdings muss für eine spezifische Anfärbung der HLA-Typ des Probanden und die Sequenz des erkannten Peptids genau bekannt sein (siehe **3.2.4**).

Eine weitere schnelle Methode stellt die Detektion aktivierter T-Zellen über ihre Expression von intra- und extrazellulären Aktivierungsantigenen im DFZ dar. Die Hochregulation von Zytokinen oder Oberflächenantigenen kann über Antikörperfärbung in kurzer Zeit gemessen werden und eignet sich daher gut für einen Einsatz in der klinischen Routine (siehe **2.2.2** und [185; 303; 366]).

1.2.5.3 Aktivierungsmarker und kostimulatorische Rezeptoren auf T-Zellen

Die Auslösung der Aktivierung in der T-Zelle führt unter anderem zur Expression verschiedener Aktivierungsmarker auf ihrer Zytoplasmamembran. Einige Aktivierungsmarker, die im Rahmen dieser Dissertation gemessen wurden, werden nur von Th-Zellen exprimiert, während der Hauptteil auch von CTLs hochreguliert werden kann:

CD69 (Activation inducer molecule)

Eine Hochregulation des Antigens CD69 kann bereits wenige Stunden nach einer erfolgten Stimulation gemessen werden. Das zuerst „activation inducer molecule“ benannte Antigen wurde als Heterodimer mit Disulfidbrücke identifiziert [59]. Die weitere genetische Charakterisierung ergab bei CD69 einen Vertreter der Lektin-Superfamilie mit 199 Aminosäuren und Transmembrantopologie [233]. Es konnten mittlerweile auch die Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für die Expression von CD69 nach unspezifischer Stimulation zuständig sind [56].

CD25 (IL-2-Rezeptor)

Das Epitop CD25 (vormals Tac) wurde als α -Kette des Rezeptors für IL-2 identifiziert. Die Stimulation mit verschiedenen Antigenen führt zur verstärkten Expression dieses Rezeptors, während die Dekoration mit einem spezifischen Antikörper die Proliferation der T-Zellen inhibiert [80]. Eine Folgearbeit konnte zeigen, dass IL-2 selbst die Expression seines Rezeptors hochregulieren kann. Damit ist es den T-Zellen möglich ihre eigene Aktivierung und Proliferation über eine positive Rückkopplung zu verstärken [79]. Das CD25-Polypeptid ist ein Transmembranprotein mit 251 Aminosäuren, von dem ein 192 Aminosäuren großes Teilstück proteolytisch abgespalten werden kann, was als sog. shedding bezeichnet wird [315]. Dabei bleibt das abgespaltene Protein ein Monomer und aggregiert nicht [186]. Darüber hinaus gelang es, den löslichen IL-2-Rezeptor im Blutserum nachzuweisen, und es zeigte sich, dass der Spiegel bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (SLE und RA) erhöht ist [343]. Bald darauf wurde entdeckt, dass der IL-2-Rezeptor eine β -Kette besitzt, die als CD122 (vorher T200) klassifiziert wurde [378]. Für seine Funktion benötigt der IL-2-Rezeptor noch eine γ -Kette, die mit CD132 bezeichnet wurde, und ein Polypeptid darstellt, das auch in Assoziation mit anderen IL-Rezeptoren gefunden wird [372]. Weitere Einsichten in die Funktion von CD25 konnten anhand einer KO-Maus erhalten werden. Die T-Zellen dieser Tiere können schlechter proliferieren, gehen *in vitro* schneller in Apoptose und sind nach einer Aktivierung gegenüber der CD95-induzierten Apoptose resistent [397].

CD152 (CTLA-4)

Ein weiterer untersuchter Aktivierungsmarker ist CD152, das Zytotoxische T-Lymphozyten-Assoziierte Antigen 4 (CTLA-4). Ausgehend von der bekannten DNA-Sequenz der Maus konnte das Gen dieses Aktivierungsmarkers mit einer Homologie von 76 % auch beim Menschen gefunden werden [73]. Wie bereits angedeutet, konnte zwischen CD152 und dem Korezeptor CD28 starke Ähnlichkeiten für die DNA-Sequenz, die Proteinstruktur und den Genort festgestellt werden. Beide sind Mitglieder der Ig-Superfamilie [145]. Während CD152 nur auf aktivierten Th-Zellen und CTLs gemessen werden kann, ist CD28 auch auf ruhenden T-Zellen nachweisbar. CD152 konnte als Monomer identifiziert werden und interagiert nicht mit CD28 [225; 230]. Sowohl für CD28 als auch für CD152 konnten jeweils Interaktionen mit den DC-Antigenen CD80 und CD86 nachgewiesen werden [229]. Die Bindung des DC-Antigens CD86 hat jedoch

gegensätzliche Wirkungen: Während die Interaktion mit CD28 die Aktivierung der T-Zelle steigert, führt die Interaktion mit CD152 zu einer Inhibierung der Proliferation [209]. Diese deaktivierende Funktion von CD152 konnte in KO-Mäusen bestätigt werden. Diese Mäuse entwickeln eine lymphoproliferative Krankheit, die aufgrund multipler Organschäden zu ihrem frühen Tod führt [385]. Umgekehrt konnte man Mäusen im KJ-Modell eine Toleranz gegenüber dem Antigen Ovalbumin induzieren, indem man ihnen Antikörper gegen CD152 injizierte [300].

CD28

CD28 selbst ist, wie in **1.2.5.1** beschrieben, ein wichtiger Korezeptor auf den T-Zellen. Wie bei CD154 handelt es sich um ein Homodimer, das auf fast allen Th-Zellen und auf einer Subpopulation der CTLs exprimiert wird (Übersicht in [220]). Die Bindung an CD28 kann die T-Zelle alleine nicht aktivieren, erhöht jedoch die Zytokinausschüttung bei gleichzeitiger Stimulation des TCR [393]. Die Funktion eines Kostimulators konnte anhand der CD28-KO-Maus bestätigt werden [133]. Man geht davon aus, dass CD28 eine eigene Signalkaskade auslösen kann, die mit der Kinasekaskade nach einer TCR/MHC-Interaktion kooperiert (Übersicht in [191]).

CD154 (CD40 Ligand)

Das Antigen CD154 (vormals gp39, TRAP oder CD40L) wurde erstmals an T-Zelllinien beschrieben, die B-Zellen ohne Gabe eines Antigens und selbst im fixierten Zustand aktivieren können [420]. Es zeigte sich, dass das 39 kDa (später 33 kDa) große Transmembranprotein der Ligand für CD40 ist, nur auf aktivierten Th-Zellen exprimiert wird und Homologien mit TNF hat [155; 278]. Wie beim IL-2-Rezeptor kann auch bei CD154 ein Teil des Polypeptids nach proteolytischer Spaltung in Lösung gehen. Dieses lösliche CD154 ist kleiner (18 kD), funktionell und kann an CD40 binden [127]. Bereits nach einer Stimulationszeit von nur 15 min kann CD154 auf der Oberfläche von einigen Memory Th-Zellen gemessen werden, weshalb man annimmt, dass diese Th-Zellen den Liganden intrazellulär gespeichert haben. Nach 1 – 2 h kann er dann auch auf den Th-Zellen gemessen werden, die CD154 erst synthetisieren müssen [55].

CD40

Den Rezeptor für CD154 sieht man in CD40. Das Protein besteht aus 277 Aminosäuren mit einem extrazellulären Anteil von 193 Aminosäuren, hat eine Größe von 48 kDa und ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie [356]. Die

Expression von CD40 konnte unter anderem auf B-Zellen, Monozyten, DCs und diversen Epithelzellen nachgewiesen werden. Die Interaktion mit CD154 führt bei B-Zellen und DCs zur Expression von Oberflächenantigenen und Zytokinen; zusätzlich sezernieren die B-Zellen Antikörper und bei DCs leitet die Assoziation deren Reifung ein (Übersicht in [272; 396]).

CD134 (Ox40)

Der Rezeptor CD134 (vormals Ox40) konnte hauptsächlich auf aktivierten Th-Zellen identifiziert werden. Die Klonierung des Gens ergab ein Transmembranprotein mit 235 Aminosäuren (extrazellulärer Anteil: 191 Aminosäuren) aus der Superfamilie der TNF-Rezeptoren [243]. Die Inhibierung von CD134 mittels Antikörper in einer Maus mit experimenteller Autoimmunkrankheit führte *in vitro* und *in vivo* zu einer deutlich verringerten Aktivierung der Th-Zellen und zu einer Besserung der Krankheit [409]. Der Verlust des CD134-Gens in der KO-Maus führt zu einer Beeinträchtigung der Th-Zellen in ihrer Fähigkeit zu proliferieren und IFN- γ zu produzieren [204].

CD134 Ligand

Infolge einer CD40/CD154-Interaktion wurde erstmals an murinen B-Zellen gezeigt, dass diese einen Liganden für CD134 (CD134L) hochregulieren. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor CD134 wiederum führt zu einer zusätzlichen Stimulation der B-Zellen [360]. In einer Studie am PCC-Modell wurden die Th-Zellen der Mäuse *in vitro* mit antigenpräsentierenden Fibroblasten, die zusätzlich CD134L exprimierten, stimuliert. Die Expression von Zytokinen durch die Th-Zellen war aber nur dann verstärkt zu beobachten, wenn die Fibroblasten zusätzlich CD80 fremdexprimierten [128]. Das Antigen CD134L wird ebenfalls von unreifen und reifen DCs exprimiert [287].

Diese Befunde zeigen, dass zwischen Th-Zellen, B-Zellen und DCs vielfältige Möglichkeiten existieren miteinander zu interagieren. Die Aktivierung der Th-Zellen hat außer einer verstärkten Expression von Aktivierungsantigenen weitere Konsequenzen.

1.3 T-Zellgedächtnis

Parallel zu ihrer Teilung konnte man bei den Th-Zellen eine Entwicklung zu Effektor und Memory Th-Zellen nachweisen, die teilweise für Jahre im Organismus verbleiben und damit einen Bestandteil des Immungedächtnisses darstellen.

1.3.1 Proliferation und Differenzierung der Th-Zellen

Die der Stimulation folgende Zellteilung führt zu einer klonalen Expansion der jeweiligen antigenspezifischen Th-Zellen, was man als einen signalverstärkenden Schritt in der Immunantwort sehen kann.

Im PCC-Modell wurde bei der Untersuchung des Lymphknotens festgestellt, dass die Zahl der antigenspezifischen Th-Zellen um den Faktor 27 bis zum 6. Tag ansteigt. Nach 8 Wochen reduzieren sich die Th-Zellen auf den 2 fachen Ausgangswert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Antigen eine Art Selektion des TCRs im Bereich des CDR3 induziert [254]. Dies konnte später *in vitro* mithilfe rekombinanter MHC-II-Tetrameren (siehe 1.2.5.2) in Form ihrer besseren Bindung bestätigt werden [336]. Darüber hinaus wurde diese schnelle Selektion des TCR in den T-Zellzonen im Parakortex des Lymphknotens lokalisiert [253]. Am KJ-Modell konnte gezeigt werden, dass die transferierten antigen-erfahrenen Th-Zellen langsamer proliferieren als die naiven Th-Zellen. Das Merkmal einer schnellen Proliferation erlangen die antigenstimulierten Th-Zellen wieder, wenn sie in ein ungeimpftes Empfängertier und damit in eine naive Umgebung transferiert werden [258].

Die Proliferation der Th-Zellen nach der Interaktion mit den DCs ist verbunden mit der Produktion des Zytokins IL-2, von dem bekannt ist, dass es *in vitro* die Teilung der T-Zellen induzieren kann [168; 169]. Diese Proliferation und IL-2-Produktion kann durch die Gabe des Antigens und LPS im KJ-Modell verstärkt werden. Jedoch zeigt der Transfer der Th-Zellen in IL-2- oder CD28-KO-Mäusen, dass die (verstärkte) Proliferation *in vivo* nicht von der Sekretion des IL-2, sondern von der Interaktion des Korezeptors CD28 abhängt [197].

Mit der Proliferation geht die Differenzierung der naiven Th-Zellen einher, die sich in verschiedenen Isoformen des Antigens CD45 manifestiert. Beim Menschen exprimieren die naiven Th-Zellen und CTLs die größte Isoform CD45RA, während die Effektor und Memory Th-Zellen/CTLs mit CD45RO die kleinste Isoform besitzen. Der Wechsel von der RA- zur RO-Isoform wird von der Aktivierung der

T-Zellen herbeigeführt [2]. Untersuchungen konnten zeigen, dass für die verschiedenen Isoformen das alternative splicing ursächlich ist. Den Ausschlag gibt die Aktivität des Ras-Proteins oder der Proteinkinase C [238]. Die Entdeckung von dimerisierten Formen von CD45 und der Befund, dass die Dimerisierung von Phosphatasen ihre Aktivität inhibiert, führten zu dem Modell, dass CD45R0 nach der Aktivierung dimerisiert, und damit die T-Zelle deaktiviert wird [150; 181; 371].

Bei der Maus unterscheiden sich naive und Effektor- bzw. Memory-Subpopulation aufgrund ihrer Expression oder Nichtexpression von CD45RB oder CD44 (naive T-Zellen: CD45RB⁺/CD44⁻ und Memory T-Zellen: CD45RB⁻/CD44⁺) [41; 86]. Eine Untersuchungsreihe an Mäusen ergab für die Memory T-Zellen eine höhere Teilungsrate als für die naiven T-Zellen. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass ältere T-Zellen in ihrem Phänotyp nicht stabil sind [388].

Der Befund der unterschiedlichen Teilungsrate von naiven und Memory T-Zellen deckt sich mit einer statistischen Auswertung publizierter Patientendaten. Dieser zufolge teilen sich die humanen naiven T-Lymphozyten alle 3,5 Jahre und die Memory T-Lymphozyten alle 22 Wochen [255].

Außer den unterschiedlichen CD45-Isoformen differieren naive und Memory Th-Zellen des Menschen auch in der Expression von Zytokinen. Während naive Th-Zellen nach unspezifischer Antigenstimulation nur die Zytokine IL-2 und TNF- α exprimieren und sezernieren können, ist es bei den Effektor und Memory Th-Zellen möglich, diese anhand ihres Zytokinprofils in die Untergruppen Th₁ und Th₂ zu unterscheiden [267]. Die Th₁-Zellen sezernieren hauptsächlich IL-2 und IFN- γ , gegenüber den Th₂-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produzieren. *In vitro* ist es möglich aus naiven Th-Zellen durch Kokultur von Antigen und Zytokin IL-12 die Th₁-Zellen und durch Kokultur von Antigen und IL-4 die Th₂-Zellen zu generieren (Übersicht in [268]). Die Veränderung des Zytokinprofils infolge der Differenzierung konnte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Diese ergaben, dass die Expression des Zytokins IL-2 vom Zellzyklus unabhängig ist, während die Zytokine IFN- γ und IL-4 erst nach einer bis drei erfolgten Th-Zellteilung(en) exprimiert werden können [40].

In der Maus kann man die Memory Th-Populationen anhand von CCR7 differenzieren. Dabei sind die Th₁-Zellen CCR7⁺ und die Th₂-Zellen CCR7⁻ [310]. Die Untersuchungen im humanen Vollblut auf CCR7 ergaben, dass naive Th-Zellen überwiegend CCR7 exprimieren, das fast immer gemeinsam mit CD62L an

der Oberfläche nachweisbar ist. Allerdings unterteilt CCR7 die humanen Memory Th-Zellen in die Subpopulation der CCR7⁺ Zentralen Memory Th-Zellen und der CCR7⁻ Effektor Memory Th-Zellen [330].

In zwei funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von naiven Th-Zellen über die Interaktion mit DCs induziert werden kann. Dazu wurden *in vitro* DCs aus Monozyten (GM-CSF/IL-4) oder BDCA-2⁺⁺ Vorläuferzellen (IL-3) generiert und ihre Reifung über rekombinantes CD154 induziert. Die Koinkubation mit naiven Th-Zellen ohne Zytokine ergibt bei den aus Monozyten generierten DCs eine Differenzierung zu Th₁-Zellen und zu Th₂-Zellen in Anwesenheit der DCs aus BDCA-2⁺⁺ Vorläuferzellen [314]. Eine zweite Studie generierte die DCs aus humanen Monozyten wie oben und es zeigte sich, dass die reifenden DCs nur in den ersten Stunden IL-12 sezernieren, was die koinkubierten naiven Th-Zellen zu Th₁-Zellen differenzieren lässt. Danach induzieren die gleichen DCs bei naiven Th-Zellen deren Differenzierung zu Th₂-Zellen [213].

Die Einteilung der Effektor Th-Zellen in nur zwei Populationen kann nicht absolut gesehen werden, da Ergebnisse vorliegen, die einer reinen Zweiteilung widersprechen:

Isolierte humane Memory Th-Zellen gesunder Spender wurden unspezifisch stimuliert und die durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Zytokine (IL-2, IL-4 und IFN- γ) ergaben einige Th-Zellen, die im Zytokinprofil zwischen den beiden Subpopulationen liegen [303]. Auch in Mäusen konnte neben den Th₁- und Th₂-Zellen eine dritte noch nicht polarisierte Gruppe identifiziert werden. Diese kann *in vitro* aus naiven Th-Zellen durch den Mangel an IL-12 oder IL-4 im Medium und einen kurzen Kontakt mit MHC-II generiert werden [166]. Eine Charakterisierung dieser dritten *in vitro* generierten Population nach Transferierung in Empfängerermäuse ergab, dass sich die nicht polarisierten Th-Zellen von den Th₁- und Th₂-Zellen durch ihre Fähigkeit unterscheiden in den Lymphknoten einwandern zu können. Von den naiven Th-Zellen unterscheiden sie sich durch ihre starke und schnelle Proliferation nach relativ schwacher Stimulation [165].

1.3.2 Interaktionen von Th- und B-Zellen

Nach und während der Proliferation und Differenzierung der Th-Zellen wandern diese im sekundären Lymphgewebe aus den Bereichen der Th-Zellen und DCs in die Bereiche der B-Zellen.

Eine Studie am KJ-Modell und eine frühere Untersuchung demonstrierten, dass die Th-Zellen und die B-Lymphozyten im Lymphknoten nach der Antigengabe an den Rand der Follikel wandern. Es folgt die Immigration der Th-Zellen in die Follikel und die Bildung von sog. Keimzentren, in denen sich die Th-Lymphozyten teilen. Danach proliferieren die B-Zellen, was wie die Keimzentrenbildung von CD154 abhängig ist [114; 119]. Zwei Untersuchungen der Mausmilz im KJ- und PCC-Modell konnten zeigen, dass auch in der weißen Pulpa dieselben Prozesse und Wanderungen wie im Lymphknoten zu beobachten sind [139]. Weiterhin wurden Chemokinrezeptoren identifiziert, die für die Verteilung der Th-Zellpopulation zuständig sind. Die CCR7⁺ naiven und Th₁-Zellen wurden in den Bereichen der PALS nachgewiesen, die keine B-Lymphozyten enthalten. Dagegen sind die CCR7⁻ Th₂-Zellen in der Nähe der B-Zellfollikel zu finden. Die retrovirale Transduktion von CCR7 in Th₂-Lymphozyten führt zu deren Rückwanderung [310]. Im murinen Lymphknoten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 auf den aktivierten Th-Zellen deren Einwanderung in die Follikel unterstützt, wo der CXCR5-Ligand B-Lymphozyten-Chemoattraktor (BLC) exprimiert wird [15].

Mit konfokaler Immunofluoreszenzmikroskopie konnte *in vitro* die Interaktion von Th- und B-Zellen demonstriert werden. Eine Proliferation der B-Zellen findet nur statt, wenn diese gleichzeitig ein Antigen präsentieren. Zwischen den Th- und B-Zellen konnte ein IL-4-reiches Milieu detektiert werden, was eine hauptsächliche Interaktion von Th₂-Zellen bestätigt [211]. Die Hilfe der Th₂-Zellen bei der Antikörperbildung konnte bereits *in vitro* demonstriert werden. Die B-Zellen produzieren in Kokultur mit naiven oder generierten Th₁- und Th₂-Zellen nur dann signifikante Mengen an Antikörper, wenn Th₂-Zellen anwesend sind. Die Menge an Ig kann noch gesteigert werden, wenn die B-Zellen über ihren MHC-II ein Antigen präsentieren und wenn die Zytokine IL-4 und IL-6 im Medium vorhanden sind [70].

Der Proliferation der B-Zellen mit der Bildung von Keimzentren folgt die Expression und Sekretion von Antikörpern [237]. Dies belegt die wichtige Vermittlerrolle der Th-Zellen im Immunsystem.

1.3.3 Th-Zellen als Teil des Immungedächtnisses

Schon bald nach der Proliferation der Th-Zellen reduziert sich ihre Anzahl durch den programmierten Zelltod (siehe 1.4). Ein kleinerer Anteil an Effektor Th-Zellen, die mit dem Antigen Kontakt hatten, geht nicht in Apoptose und verbleibt als Teil des sog. Immungedächtnisses im Organismus [16]. Die Annahme ist, dass auf diese Weise eine Immunreaktion schneller erfolgen kann, wenn der Organismus abermals mit einem bereits „bekannten“ Antigen konfrontiert wird.

Am PCC-Modell konnte ein direkter Übergang der Effektor Th-Zellen zu ruhenden Memory Th-Zellen nachgewiesen werden. Dafür wurden naive Th-Zellen *in vitro* stimuliert, radioaktiv markiert und die Effektor Th-Zellen den Mäusen retransferiert. Die nach mehreren Tagen wiedergewonnenen Th-Zellen hatten sich kaum geteilt und besaßen die Merkmale von Memory Th-Zellen [159].

Zur Frage einer bleibenden Prägung der Memory Th-Zellen gibt es widersprüchliche Ergebnisse: In einer früheren Studie konnte am PCC-Modell gezeigt werden, dass die Memory Th-Zellen ihre Prägung behalten. Antigen-spezifische Th₁- und Th₂-Effektorzellen wurden *in vitro* generiert und in bestrahlte Empfänger-mäuse transferiert. Die nach mehreren Wochen wiedergewonnenen Memory Th-Zellen hatten ihre Fähigkeit zur Produktion der jeweiligen Zytokine nach Antigenstimulation nicht verloren [367]. Demgegenüber konnte später am KJ-Modell gezeigt werden, dass sich die Memory Th-Zellen bezüglich der Proliferationsfähigkeit zu naiven Th-Zellen zurückentwickeln können (siehe 1.3.1 und [258]).

1.3.4 Zirkulation der Th-Zellen im Organismus

Die Th-Zellen verbleiben nur für einen relativ kurzen Zeitraum in den sekundären Lymphgeweben. Der überwiegende Teil der Th-Zellen zirkuliert hingegen über Blutkreislauf und/oder Lymphsystem pro Tag ein bis zweimal im Organismus. Infolgedessen kommen die Th-Zellen immer wieder in die sekundären Lymphgewebe zurück, was man als homing bezeichnet. Man nimmt an, dass die Regulation der Th- und CTL-Zellzahl, die sog. Homeostase, mit dem homing in Zusammenhang steht [52].

Im KJ-Modell konnte in Ganzkörperschnitten die unterschiedliche Migration der transferierten Th-Zellen im Organismus gezeigt werden. Nach der Gabe des Antigens kommt es zuerst zur Proliferation der naiven Th-Zellen in den sekundären Lymphgeweben. Nach einigen Tagen können diese Th-Zellen als

Memory Th-Zellen in Geweben (Lunge, Leber, Darm, etc.) identifiziert werden, in die sie infolge der Impfung eingewandert sind. Die additive Gabe von LPS erhöht nicht nur die Anzahl der Th-Zellen, sondern führt auch zum längeren Verbleib dieser im Organismus [312]. Eine *in vivo* Studie an Schafen ergab, dass naive und Memory T-Zellen unterschiedlich rezirkulieren: Naive T-Zellen gelangen über das Blut und die HEVs in die efferenten Lymphgefäße und anschließend in den Lymphknoten. Dagegen gelangen die Memory T-Zellen über das Blut in die peripheren Gewebe und von dort über die afferenten Lymphgefäße in den Lymphknoten [241]. Auf die Steuerung dieser Wanderungen über Chemokine und deren Rezeptoren wurde bereits eingegangen (siehe **1.2.4**).

1.4 Entfernung der T-Zellen über Apoptose

Eine unzureichende Eliminierung aktivierter antigenspezifischer T-Zellen wird, wie bereits erwähnt, als eine potenzielle Ursache für die Induktion einer Autoimmunerkrankung gesehen. Eine Untersuchung der T-Zellen bezüglich ihrer Apoptose an Blutproben erkrankter Personen in klinischen Studien erscheint daher als ein möglicher Zugang zur weiteren Aufklärung der zellulären Störungen.

1.4.1 Bedeutung der Apoptose

Der programmierte Zelltod oder Apoptose wird als Prozess definiert, der in der Zelle aktiv durchgeführt wird und der ihre Elimination zum Ziel hat [131]. Im Gegensatz dazu wird die Nekrose als passiver Vorgang gesehen, der unkontrolliert abläuft.

Im Immunsystem des Menschen spielt die Apoptose eine wichtige Rolle: Zum einen werden Thymozyten über Apoptose selektiert, die eine zu starke Affinität ihres TCR gegenüber körpereigenen Antigenen besitzen. Diese Eliminierung autoreaktiver und unreifer T-Zellen erfolgt über den sog. aktivierungsinduzierten Zelltod [132; 351]. Aber auch unerwünschte und unreife B-Zellen können auf diese Weise aus dem Organismus entfernt werden (Übersicht in [376]). Die andere wichtige Rolle der Apoptose im Immunsystem ist die der Eliminierung von expandierten Effektorzellen. Mittels aktivierungsinduzierter Apoptose wird die Zahl dieser T-Zellen wieder zurückgeführt [218].

Die Apoptose selbst setzt sich aus drei Phasen zusammen: Induktion, Exekution und Endphase. Diese sollen nachfolgend genauer erläutert werden:

1.4.2 Induktion der Apoptose über CD95

Der am besten charakterisierte Weg die Apoptose zu induzieren ist die Signalkaskade über CD95 (vormals APO-1 oder Fas, Übersicht in [348]).

Der Rezeptor CD95 ist ein 335 Aminosäuren (45 - 52 kDa) großes Transmembranprotein, das zur Superfamilie der TNF-Rezeptoren gehört [175; 282]. Seine Expression konnte auf aktivierten T- und B-Zellen, Tumorzellen und vielen anderen Körperzellen nachgewiesen werden [217]. CD95 kann zum einen durch die Bindung des spezifischen Antikörpers aktiviert werden, was zu seiner Entdeckung führte [390; 422]. Eine andere Möglichkeit zur Induktion ist die Bindung des CD95 Liganden (CD95L). Dieser Ligand wurde als 40 kDa Transmembranprotein identifiziert, das zur Familie der TNFs gehört [362]. CD95L konnte auf der Oberfläche von aktivierten CTLs, NK-, Th-Zellen und Zellen von sog. Immunprivilegierten Geweben nachgewiesen werden. Diese Gewebe schützen sich auf diese Weise vor aktivierten T-Zellen [135; 291; 361]. Eine Studie demonstrierte, dass CD95L abgespalten werden kann, und damit seine Aktivität reguliert werden kann, da lösliches CD95L die Aktivität des membranständigen inhibiert [373].

Als wichtigste Funktion des CD95-CD95L-Systems wird die Beseitigung aktivierter T-Zellen aus dem Organismus gesehen. Die Inkubation CD3-stimulierter humaner T-Zellen mit anti-CD95 oder rekombinanten CD95L *in vitro* führt in den aktivierungsinduzierten Zelltod oder zur Zytolyse [5]. Dies konnte auch in einer Studie an Mäusen, denen antigenspezifische Th-Zellen transplantiert wurden, gezeigt werden. Die murinen Th-Zellen gingen nach einer Antigenaktivierung *in vitro* und *in vivo* über den CD95 vermittelten Signalweg in Apoptose [398]. Bestätigt wurde die wichtige Rolle von CD95 und CD95L an mutierten Mäusen, deren Leukozyten ein defektes CD95- (*lpr*-Maus) oder CD95L-Molekül (*gld*-Maus) exprimieren. Die Folge ist in beiden Fällen eine Autoimmunerkrankung die in den Tieren schwere Schäden verursacht (Übersicht in [270]). Diese folgenreichen Mutationen konnten auch beim Menschen als Autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom beschrieben werden. Die Patienten haben verschiedene Mutationen im Gen des CD95 oder CD95L mit der Konsequenz ähnlicher Symptome wie die der Mäuse [249; 358].

Die mehrfach postulierte wesentliche Rolle von CD95 in der T-Zellentwicklung konnte nicht bewiesen werden, da bei den *lpr*-Mäusen keine Beeinträchtigung der Thymozytenselektion zu erkennen ist [152].

Außer seiner Bedeutung ist auch die Signalübertragung des Rezeptors CD95 beschrieben. Wenn CD95L oder ein Antikörper an CD95 gebunden hat, führt dies zur Zusammenlagerung von drei CD95-Monomeren. Der mit 80 Aminosäuren kleinere intrazelluläre Teil von CD95, die sog. Todesdomäne (DD), trimerisiert ebenfalls. Aus den drei DDs, zwei Fas-assoziierten Todesdomänen (FADD, vormals MORT1), dem Protein CAP3 und der Procaspase-8 (vormals FLICE oder CAP4) bildet sich der Todinduzierende Signalkomplex (DISC) [257]. FADD hat selbst eine DD und kann über diese mit CD95 interagieren [62]. Ein anderer Teil der FADD, die sog. Todeseffektordomäne, interagiert ihrerseits mit der Procaspase-8 was zur ihrer Spaltung und Aktivierung führt [269]. Neuere Studien konnten zeigen, dass CD95 in lipid rafts auf der Zellmembran vorliegt. Nach Aktivierung von CD95 konnten auch FADD und Caspase-8 in diesen rafts gefunden werden [161].

Im weiteren Verlauf dieser Signalübertragung spaltet und aktiviert Caspase-8 unter anderem die Procaspase-3, was die weitere Exekution der Apoptose zur Folge hat (siehe **1.4.4**).

Neben FADD konnte mit Daxx ein weiteres Protein identifiziert werden, dass mit der DD von CD95 interagiert. Daxx spaltet keine Caspasen, sondern aktiviert die c-Jun N-terminale Kinase (JNK, vormals SAPK) [419]. Die JNK liegt in drei Isoformen vor und reguliert c-Jun und andere Transkriptionsfaktoren. Je nach Studie hat ihre Aktivierung entweder pro-, antiapoptotische oder keine Wirkung. Es gibt Hinweise, dass weitere Faktoren und Signalwege (z. B. über NF- κ B) den Ausschlag geben (Übersicht in [224]). Andere Untersuchungen sehen JNK als essentiell für die Differenzierung naiver Th-Zellen zu Th₁-Zellen und für die Expression ihrer Zytokine (Übersicht in [84]).

1.4.3 Induktion der Apoptose über andere Mechanismen

Aus der Familie der TNF-Rezeptoren wurden neben CD95 noch fünf weitere Vertreter identifiziert: DR3 (oder TRAMP), DR6, TRAIL-R1 (oder DR4), TRAIL-R2 (oder DR5) und CD120a (oder TNF-R1). Ein gemeinsames Charakteristikum ist die intrazelluläre DD. Nach der Bindung eines Liganden aus der TNF-Familie (z. B. TNF, TRAIL, etc.) erfolgt die Oligomerisation des Rezeptors, der über Adapterprotein(e) und Caspasen (teilweise FADD und Procaspase-8) die Apoptose auslösen kann [341]. Darüber hinaus wurden vier weitere Rezeptoren beschrieben, die mit den TNF-Rezeptoren eng verwandt sind. Welche genaue

Funktion TRAIL-R3, TRAIL-R4, OPG und DcR-3 außer der Bindung ihres Liganden haben, konnte bisher nicht geklärt werden (Übersicht in [335]).

Über die rezeptorinduzierte Apoptose konnte ein verstärkender intrazellulärer Mechanismus entdeckt werden, bei dem die Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen. Wenn Caspase-8 das Protein Bid spaltet, so transloziert dieses zu den Mitochondrien und verursacht als integrales Membranprotein das Austreten von Cytochrom C ins Zytosol [137; 222; 236]. Das Cytochrom C formiert mit dem apoptotischen proteaseaktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und Procaspase-9 das sog. Apoptosom [427]. Die Spaltung und Aktivierung von Procaspase-9 führt zur Spaltung und Aktivierung von Procaspase-3, was wiederum die Apoptose vorantreibt [223; 231].

Die Induktion der Apoptose in virusbefallenen Zellen oder Tumorzellen durch CTLs erfolgt entweder über CD95L/CD95 oder über Perforin/Granzym.

Eine erste Studie identifizierte das Granzym A als Serinprotease, die von CTLs sezerniert wird und in den Zielzellen die Fragmentierung der DNA induziert. Dies kann über Hemmstoffe blockiert werden, während die Lyse der Zielzellen davon nicht betroffen ist [147]. Danach gelang es, das Granzym B (vormals Fragmentin) zu charakterisieren, das die gleichen Eigenschaften wie Granzym A besitzt und auch von NK-Zellen exprimiert wird [350]. Eine Folgearbeit beschreibt die Granzyme und das Perforin als Serinproteasen mit unterschiedlichen Charakteristika [349]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich die zytolytische Wirkung des Perforins und die nukleolytischen Wirkungen des Granzym A und B addieren und weisen die Hauptrolle bei der Tumorabwehr den Granzymen zu [273]. Die Zerstörung der Gene im Mausmodell bestätigte die gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion dieser drei Serinproteasen. Die Perforin KO-Maus besitzt CTLs und NK-Zellen, die nicht in der Lage sind virusbefallene Zellen zu lysieren [188]. Das Ausschalten der beiden oder eines der Granzymgene erbrachte Mäuse mit CTLs und NK-Zellen, die in Zielzellen keine DNA-Fragmentierung induzieren können. Jedoch ist die Fähigkeit zur Zelllyse nicht beeinträchtigt [75].

Desweiteren kann die Apoptose über eine Vielzahl von Reagenzien induziert werden, deren Wirkungsweisen nicht immer bekannt sind. Die entsprechenden Chemikalien wurden parallel zu den durchgeführten Versuchen in **3.4** angegeben.

1.4.4 Exekution und Regulation der Apoptose

An der Ausführung des programmierten Zelltods ist die Gruppe der Caspasen wesentlich beteiligt. Caspasen sind Proteasen, die sich wechselseitig spalten und aktivieren können (Übersicht in [381]).

Die Aktivierung von Caspase-3 (vormals CPP-32) setzt einen unumkehrbaren Zerstörungsmechanismus in Gang. In ihrer Funktion als Protease spaltet sie strukturelle Proteine, Kinasen, Zellzyklusproteine, DNA-Reperaturenzyme und Signalproteine. Zusätzlich wird die Aktivität von Endonukleasen (z. B. die capaseaktivierte Deoxyribonuklease) induziert, die die genomische DNA in Bruchstücke zwischen 50 und 300 kb spalten [93]. Die Strukturuntersuchungen an Caspasen ergaben, dass sie in der inaktiven Form als Dimer vorliegen. Die Spaltung dieses Dimers und die Zusammenlagerung zu einem Tetramer mit zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten führt zur Aktivierung dieser Enzyme [43; 261].

Es wurden neben den induzierenden auch inhibierende Proteine identifiziert, die der Apoptose entgegenwirken. Beispielsweise konnten virale und zelleigene Inhibitoren, sog. FLIPs, beschrieben werden, die über eine eigene Todeseffektor-domäne an den DISC assoziieren. Damit können sie die Signaltransduktion von CD95 oder verwandter TNF-Rezeptoren an die jeweiligen Caspasen verhindern [170; 380]. Aber auch CD95 selbst ist nicht ausschließlich für die Induktion der Apoptose zuständig. Eine Studie belegte, dass die Signalkaskade des TCR unterdrückt wird, wenn CD3 und CD95 über Antikörper gebunden werden [206]. Die Ursache konnte in Form von sauren Sphingomyelinasen entdeckt werden, deren Aktivierung über CD95 zur Ausschüttung von Ceramiden führen. Diese Ceramide können die Kalziumkanäle und damit den Kalziumeinstrom in die Zelle reversibel blockieren [221].

Eine weitere für die Regulation der Apoptose wichtige Proteingruppe stellen die Mitglieder der Bcl-2-Familie dar (Übersicht in [136]). Erstmalig wurde die Bedeutung von Bcl-2 bei Patienten mit B-Zellleukämie erkannt. Die Translokation des codierenden Gens und die unkontrollierte Expression des antiapoptotischen Proteins sind kausal für diese Leukämie [392]. Auch das Protein Bcl-x_L wurde als antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie beschrieben [124].

Andere Mitglieder dieser Familie (z. B. Bid, Bad, Bax oder Bim) haben die entgegengesetzte Wirkung. Bei beiden Gruppen konnten Vertreter beschrieben werden (Bcl-2, Bcl-x_L, Bid und Bax), die die Fähigkeit besitzen Poren in

Plasmamembranen auszubilden. Allerdings konnte bisher nicht bewiesen werden, dass Bid oder Bax dies bei Mitochondrienmembranen tun und damit den Zelltod auslösen (Übersicht in [337]). Die Beteiligung von Bid an der Verstärkung der induzierten Apoptose wurde bereits dargestellt.

Eine Theorie geht davon aus, dass das Verhältnis dieser verschiedenen Proteine entscheidet, ob die Zelle in Apoptose geht oder nicht [136]. Eine andere Theorie postuliert eine modifizierte Formierung des bereits beschriebenen Apoptosoms. In Überexpressionsmodellen konnte gezeigt werden, dass bei Bindung von Bcl-x_L am Apoptosom die Caspase-9 inaktiv ist [296]. Bisher konnte jedoch keine der beiden Theorien vollständig bestätigt werden.

1.4.5 Folgen der Apoptoseinduktion

Die Exekution der Apoptose mündet anschließend in ihre Endphase. Bereits wenige Stunden nach Aktivierung der Caspasen kann der programmiert ablaufende Zelltod über die Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) extrazellulär detektiert werden.

Das PS wird im Golgi-Apparat synthetisiert und danach zu den Mitochondrien transloziert. Ein an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiertes Enzym decarboxyliert PS zu Phosphatidylethanolamin, das danach als Vesikel zur Zytoplasmamembran gelangt. Eine intakte Zytoplasmamembran hat PS nur in der inneren Schicht, während Phosphatidylethanolamin nur in der äußeren Schicht zu finden ist [78; 180; 399]. Die bisher postulierte Ursache der PS-Exposition ist der Ausfall einer Translokase infolge des Zelluntergangs. Die Aufgabe dieses Enzyms ist die Aufrechterhaltung der ungleichen Phospholipdverteilung in der inneren und äußeren Zytoplasmamembranschicht [401]. Eine andere Hypothese sieht die Ursache der PS-Exposition in der Störung der Decarboxylierung infolge des Funktionsausfalls der Mitochondrien im Verlauf der Apoptose.

Bereits vor der Entdeckung ihrer Ursache konnte geklärt werden, welchen Sinn die PS-Exposition hat. Sowohl Liposomen als auch apoptotische Zellen werden von Makrophagen phagozytiert, wenn sie PS an der Zelloberfläche exponieren [101; 250]. Der zugehörige PS-Rezeptor konnte ebenfalls identifiziert werden. Außer von Makrophagen wird er von Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert. *In vitro* sind diese Zellen in der Lage apoptotische Zellen zu erkennen und zu phagozytieren. Diese Fähigkeit erhalten auch T- oder B-Zellen, die den PS-

Rezeptor fremdexprimieren [99]. Eine Folgestudie an Mäusen belegte diese Ergebnisse für Makrophagen und Fibroblasten *in vivo* [100].

Eine weitere Folge der ablaufenden Apoptose ist der Abbau des Zytoskeletts und die Bildung von apoptotischen Körperchen [319]. Man nimmt an, dass damit die Phagozytose erleichtert werden soll. Mit der Entfernung der apoptotischen Zellen aus dem Organismus ist das Ziel des programmierten Zelltods erreicht.

1.4.6 Analytik apoptotischer Zellen

Eine Übersicht der verschiedenen Detektionsmöglichkeiten für apoptotische Zellen mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie bietet [74]. Aus den etablierten Methoden zur Detektion apoptotischer Zellen im DFZ wurden in dieser Arbeit insgesamt drei Protokolle herangezogen (siehe **2.2.3**). Diese sind einfach durchzuführen und ermöglichen eine schnelle und spezifische Detektion der apoptotischen T-Zellen in Form einer abgesetzten Subpopulation:

Die Exposition von PS an der Zelloberfläche infolge des Zelluntergangs kann mit farbstoffmarkierten Annexin V detektiert werden, das spezifisch an PS bindet. Eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI), das in Zellen deren Plasmamembranintegrität zerstört ist die DNA anfärbt, ermöglicht eine Differenzierung in apoptotische und nekrotische T-Zellen [402].

Desweiteren wurde die intrazelluläre Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 mit einem fluorchromkonjugierten Antikörper gemessen [400]. Eine erfolgreiche Induktion der Apoptose kann auf diese Weise überprüft werden.

Die dritte Methode ist die Färbung der T-Zellmitochondrien mit JC-1, dessen Signal vom Protonengradient der Mitochondrien abhängig ist. Kommt es infolge der Apoptose bei den T-Zellmitochondrien zum Zusammenbruch ihrer Membranintegrität, so fluoresziert JC-1 grün statt orange [68]. Auf diese Weise lassen sich vitale und apoptotische Zellen schnell und einfach unterscheiden.

Die weiteren Protokolle sind ebenfalls etabliert, wurden aber nicht verwendet, da sie spezifische Probleme aufzeigen: Im sog. FLICA-Assay werden apoptotische T-Zellen mit Substanzen inkubiert, die von Caspasen gespalten werden, an diese irreversibel binden und fluoreszieren [36]. Dieses und ein ähnliches Protokoll ergeben in gemischten und nicht synchronisierten Zellkulturen nur geringe Anteile an positiven Zellen, da die Caspasen lediglich für einen kurzen Zeitraum aktiviert sind [162].

Der sog. TUNEL-Assay, bei dem die im Verlauf der Apoptose degradierte DNA enzymatisch an Fluorochrome gekoppelt wird, ist aufgrund seines hohen Zeitaufwands für eine routinemäßige Untersuchung ungeeignet [125].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte zuerst ein einfacher und spezifischer Vollblutansatz zur Detektion antigenspezifischer Th-Zellen über ihre Stimulation mit Antigenen entwickelt werden. Als Antigene sollten entweder Gesamtproteine oder einzelne Peptide verwendbar sein. Zur Optimierung des Ansatzes sollten alle Parameter der Inkubation und der Identifikation der aktivierten Th-Zellen ausgetestet werden. Eine Überprüfung der Spezifität der Stimulation sollte gewährleisten, dass die gemessene T-Zellaktivierung nur durch die Antigene induziert wird. Darüber hinaus sollte ein Protokoll zur gezielten Identifizierung Cytomegalovirus (CMV)-spezifischer CTLs über HLA-A2-Tetramere in Form einer europäischen Ringversuchsreihe evaluiert werden.

Nach der Entwicklung und Überprüfung des Stimulationsansatzes sollte dieser zur Detektion GAD-spezifischer T-Zellen erprobt werden, um Erkenntnisse für einen möglichen Einsatz dieses Verfahrens in der klinischen Routine zu gewinnen.

Desweiteren sollte ein Verfahren zur Generierung apoptotischer T-Zellen etabliert werden, wozu verschiedene die Apoptose induzierende Reagenzien erprobt werden sollten. Danach sollten die T-Lymphozyten von Autoimmunpatienten und gesunden Probanden auf ihre Bereitschaft zum programmierten Zelltod im Vergleich untersucht und mit diversen Methoden eingehender charakterisiert werden. Diese Studien sollten durch begleitende Untersuchungen bestimmter Leukozyten des CD-1-Systems abgerundet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Die experimentellen Arbeiten erfolgten ausschließlich mit nachfolgend aufgeführten Hilfsmitteln. Die fluorochromkonjugierten Antikörper (hauptsächlich murinen Ursprungs) wurden für die Messungen im Durchflusszytometer (DFZ) verwendet. Soweit hierzu unmarkierte Antikörper herangezogen wurden, wurden diese mittels farbstoffkonjugierter Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Einige der unmarkierten, monoklonalen und azidfreien Antikörper wurden zur Inkubation mit den Zellen in die Kultur gegeben.

Die fluoreszierenden Reagenzien und die den Kulturen zugegebenen Peptide oder Reagenzien wurden in der höchstmöglichen Reinheit eingesetzt.

2.1.1 Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Konjugiert mit	Hersteller
Bcl-2	124	FITC	DAKO, Glostrup, DK
CD1c	AD5-8E7	Biotin PE	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
CD1d	CD1d42	PE	Becton-Dickinson, San Jose, USA
CD3	UCHT1	PE	Beckman-Coulter, Krefeld, D
CD3	SK7	APC FITC PerCP	Becton-Dickinson
CD4	SK3	PerCP	Becton-Dickinson
CD8	SK1	APC FITC PE PerCP	Becton-Dickinson
CDw17	G035	FITC	Becton-Dickinson

CD25	2A3	FITC PE	Becton-Dickinson
CD25	M-A251	APC	Becton-Dickinson
CD45	2D1	PerCP	Becton-Dickinson
CD45RA	HI100	FITC	Becton-Dickinson
CD45R0	UCHL-1	FITC	Beckman-Coulter
CD45R0	UCHL-1	APC	Becton-Dickinson
CD57	HNK-1	FITC	Becton-Dickinson
CD62L	Dreg-56	CyChrome	Becton-Dickinson
CD65s	VIM2	FITC	Caltag, Burlingame, USA
CD69	L78	FITC PE	Becton-Dickinson
CD71	YDJ1.2.2	FITC	Beckman-Coulter
CD77	38-13	Unkonjugiert	Beckman-Coulter
CD95	7C11	Unkonjugiert	Beckman-Coulter
CD134	L106	PE	Becton-Dickinson
CD152	BNI3	PE	Becton-Dickinson
CD154	89-76	PE	Becton-Dickinson
Ceramid	MID 15B4	Unkonjugiert	Alexis, Grünberg, D
Goat anti mouse	Polyklonal	FITC	Becton-Dickinson
Goat anti rat	Polyklonal	PE	Dianova Hamburg, D
HLA-DR	L243	PerCP	Becton-Dickinson
IFN- γ	25723.11	FITC	Becton-Dickinson
IL-2	5344.111	PE	Becton-Dickinson
IL-10	JES3-19F1	APC	Becton-Dickinson
Lin-1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)	SK7, 3G8, SJ25C1, L27, M ϕ P9, NCAM16.2	FITC	Becton-Dickinson
TCRAV24S1	C15	PE	Beckman-Coulter

Tab. 2.1: Antikörper

2.1.2 Verwendete fluoreszierende Substanzen

Reagenz	Hersteller
Annexin V-Fluos	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Annexin V-APC	Caltag
CaliBRITE-Beads	Becton-Dickinson
Flow-Count Fluorospheres	Beckman-Coulter
FluoroQuench AO/EB-Lösung	BAG, Lich, D
HLA-A*0201-NLVPMVATV-Tetrameren gekoppelt an PE	Beckman-Coulter
JC-1 [5,5',6,6' tetrachloro-1,1',3,3'-tetra- ethylbenzimidazol-karbozyanin iodid]	Mo Bi Tec, Göttingen, D
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen, D
Streptavidin-APC	Becton-Dickinson

Tab. 2.2: Sonstige Farbstoffe

2.1.3 Verwendete Peptide

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Protein	Hersteller
GP01	N-DVNYAFLHATDLLPACDGER	Humane GAD	Roche Penzberg, D
GP02	N-PTIAFLQDVMNILLQYVVK		
GP03	N-PRYFNQLSTGLDMVGLAADW		
GP04	N-DGIFSPGGAISNMYAMMIAR		
GP05	N-GMAALPRLIAFTSEHSHFSL		
GP06	N-TDSVILIKCDERGMIPSDL		
GP07	N-KHKWKLSGVERANSVTWNPH		
GP08	N-QNCNQMHASYLFQQDKHYDL		
GP09	N-FWYIPPSLRTLEDNEERMSR		
GP10	N-RMMEYGTTMVSQPLGDKVN		
GP11	N-FFRMVISNPAATHQDIDFLI		
NCP	N-LQKLRSLEFHKEKVEPLIKV	Kontrolle	Roche
pp65	N-NLVPMVATV	CMV	PepScan, Berlin, D
TTP1	N-IDKISDVSTIVPYIGPALNI	TT	PepScan

TTP2	N-NNFTVSFWLRVPKVSASHLE		
TTP3	N-ELFTFGGQDANLISIDIKND	TT	Roche
TTP4	N-NSTKIYSYFPSVISKVNQGA		

Tab. 2.3: Eingesetzte Peptide

2.1.4 Sonstige Reagenzien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
2-Chloradenosin	Alexis
HLA-DR und -DQ Mikrotestkammern	BAG
Kaninchenkomplement	
Ortho-mune lysing reagent	Beckman-Coulter
FACS-Clean	Becton-Dickinson
FACS-Flow	
FACS-Lysing solution	
FACS-Permeabilizing solution	
FACS-Rinse	
Probenröhrchen	
Sterile 6-, 12-, 24-Lochplatten	
Sterile Einmalspritzen und Kanülen	
TruCount Röhrchen	
Biocoll Separationslösung (Dichte: 1,077 g/cm ³) Dulbecco's PBS ohne Kalzium und Magnesium RPMI1640-Medium ohne Glutamin	Biochrom, Berlin, D
Sterile Pipettenspitzen	Biozym, Oldendorf, D
FluoroBeads-B	BmT, Krefeld, D
2-Propanol (70 %)	Braun, Melsungen, D
Steriles destiliertes Wasser	
<i>M. tuberculosis</i> -Lyophilisat	Difco, Detroit, USA
Combitips	Eppendorff, Hamburg, D
Sterile Reaktionsgefäße	
Dulbecco's PBS mit Kalzium und Magnesium	Gibco, Paisley, USA
Sterile 96-Lochplatten	Nunc, Wiesbaden, D

Sterile Filter (Porengröße 0,2 µm)	Pall, Ann Arbor
Tetanustoxoidlösung (15 mg/ml)	Roche
Monovetten zur Blutentnahme versehen mit Lithium-Heparin, Zitrat, EDTA oder CPDA Multifly-Blutentnahmenadeln Sterile Pipetten, Pipettenspitzen und Transferpipetten, Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnbrecht, D
Aprotinin Bestatin Brefeldin A 2-Chlor-2'-deoxyadenosin 2-Deoxy-D-ribose 5-Dicarboxyfluoreszeindiazetat EDTA Fötales Kälberserum Humanserum AB Ionomycin Methotrexat Monensin PMA Staurosporin Trinatriumzitat Zitronensäure	Sigma

Tab. 2.4: Sonstige Reagenzien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien

2.1.5 Verwendete Geräte und Software

Gerät oder Software	Hersteller
Power Mac G3 Power Mac G4	Apple Computer Inc., Cupertino, USA
Hämatologieinstrument „ADVIA120“	Bayer, Leverkusen, D
Durchflusszytometer „FACSCalibur“ Software „CELLQuest 3.3“ Software „Attractors 1.0“ Software „FACSComp 4.0“	Becton-Dickinson
Brutschrank „BB6220“ Sterilbank „LaminAir HB 2472“ Zentrifuge „Megafuge 1.0 bzw. 1.0 R“	Heraeus, Hanau, D
Mikroskop-Fotometer „Patimed“	Leitz, Wetzlar, D

Tab 2.5: Geräte und Software

2.1.6 Blutproben

Die verwendeten Frischblutproben wurden den Patienten bzw. den Thrombozytenspendern über Venenpunktur entnommen. Bei beiden Gruppen wurde vorher eine Risikobelehrung durchgeführt und das Einverständnis gemäß dem Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikums eingeholt. Im Falle einer Stimulation mit TT wurden vorwiegend Spender herangezogen, deren letzte Impfung nicht länger als 10 Jahre zurücklag.

2.1.7 Statistische Auswertung

Nach der Analyse der Messung und Bestimmung der Einzelwerte erfolgte die Berechnung von Durchschnitt und Standardabweichung mit dem Programm Microsoft Excel 97. Die grafischen Darstellungen wurden mithilfe des Programms SigmaPlot 2001 erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Methodenoptimierung und Anwendung verschiedener Stimulationsansätze

In dieser Dissertation wurden antigenspezifische T-Zellen durch die Gabe eines oder mehrerer Antigene aktiviert und über ihre Expression von Aktivierungsmarker oder Zytokinen identifiziert (siehe **1.2.5.2**). Da antigenspezifische T-Zellen nur in geringer Frequenz im Blut vorkommen, wurden zuerst verschiedene Methoden getestet, die Stimulation zu verbessern, ohne sie unspezifisch werden zu lassen.

Ausgangspunkt war ein Protokoll nach M. A. Suni et al. zur Detektion CMV-spezifischer T-Zellen, das für die Erkennung von aktivierten TT-spezifischen Th-Zellen ungeeignet war (siehe **3.1.1** und [366]). Die Parameter dieses Protokolls wurden daher nacheinander ausgetestet und mittels Kombination mit diversen Reagenzien modifiziert.

Optimierung des Stimulationsprotokolls mit TT: Das Vollblut wurde den Probanden in Monovetten entnommen, die Lithium-Heparin als Antikoagulanzen enthielten. Nach der Vermischung wurde das Material innerhalb eines Zeitraumes von etwa 2 h aufgeteilt und angesetzt. Zum stimulierten Ansatz wurden 5 µg/ml TT und zur unstimulierten Kontrolle die gleiche Menge phosphatgepufferte Saline (PBS) zugegeben. Die Ansätze wurden danach für 6 h im Brutschrank bei 37 °C feuchter Wärme und 5 % CO₂ inkubiert. In den letzten 4 h der Inkubationszeit wurde zu beiden Ansätzen Brefeldin A (BFA) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml gegeben. 15 min vor dem Ende der Inkubationsdauer wurden die Ansätze aus dem Brutschrank entnommen, 744,4 µg/ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zupipettiert, gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen resuspendiert und danach geerntet. Das Material wurde in Probenröhrchen überführt und weiterbehandelt (siehe **2.2.2**). Für diesen und die folgenden Versuchsblöcke wurden Blutproben von jeweils vier gesunden mit TT geimpften Probanden verwendet (siehe **3.1.1**).

In einem ersten doppelten Modifizierungsschritt wurden verschiedene Antikoagulanzen gegeneinander ausgetestet. Außer den Monovetten mit Lithium-Heparin wurden Blutabnahmeröhrchen mit EDTA oder Zitrat verwendet und die

Proben wie oben angesetzt und behandelt. Darüber hinaus wurde die Inkubationsdauer von 6 auf 26 h verlängert (siehe **3.1.2**).

Als nächster Schritt sollte erprobt werden, ob verdünntes Vollblut besser stimulierbar war als unverdünntes. Dazu wurde heparinisiertes Vollblut mit RPMI1640 auf ein gleiches Endvolumen verdünnt. Der Blutanteil betrug 100, 50, 33, 25, 20 oder 10 Prozent. An den übrigen Parametern wurde nichts geändert (siehe **3.1.3**).

In der Versuchsreihe **3.1.4** wurde ausgetestet, ob die Zugabe von 744,4 µg/ml EDTA vor der Ernte einen Einfluss auf die Anzahl der aktivierten und detektierbaren T-Zellen hatte. Das auf 33 % Anteil verdünnte Vollblut wurde wie oben angesetzt. Vor der Ernte wurden die Ansätze mit PBS oder EDTA-haltigen PBS vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und geerntet.

Die Notwendigkeit einer Blockierung mit BFA wurde im Versuch **3.1.6** parallel zur Erprobung verschiedener Färbeprotokolle ausgetestet und unter **2.2.2** beschrieben.

Als letzter Parameter des Ausgangsprotokolls wurde die Inkubationszeit ausgetestet. Dazu wurde mit dem bisher modifizierten Protokoll eine Stimulationskinetik durchgeführt. Die Messungen erfolgten in den zwei Zeiträumen von 2 bis 10 und 22 bis 28 h. Sowohl auf die Blockierung mit BFA als auch auf die Zugabe von EDTA bei der Ernte wurde verzichtet (siehe **3.1.5**).

Das optimierte Stimulationsprotokoll mit Verdünnung des heparinisierten Vollblutes auf 33 % Blutanteil, Stimulation für 26 h ohne Blockierung und Ernte der Zellen ohne EDTA wurde in **3.2.1** und **3.2.2** angewandt, um die Spezifität der Stimulation zu testen.

Modifizierung des Stimulationsansatzes mit TT: Das bisher optimierte Protokoll wurde durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren verändert. Die Zugabe dieser Substanzen zu den stimulierten und unstimulierten Ansätzen erfolgte nach 9 h Vorinkubation für die verbliebenen 19 h der Reaktionszeit. Es wurden Aprotinin (1 oder 2 µg/ml) oder Bestatin (20 oder 40 µg/ml) zugegeben. Die unblockierten Ansätze und die bisherige Blockierung mit BFA (10 µg/ml) für die letzten 4 h dienten als Vergleich (siehe **3.1.7**).

Für den Inhibitor Aprotinin wurden daraufhin verschiedene Konzentrationsstufen erprobt. Nach 9 h Vorinkubation wurden 0, 2, 4, 8, 16 oder 32 µg Aprotinin pro ml Medium für die verbliebenen 19 h gegeben (siehe **3.1.8**).

Eine anschließend erfolgte Kinetik mit 2 µg/ml Aprotinin, das entweder sofort oder nach Ablauf von 2, 4, 6 oder 8 h zugegeben wurde, sollte klären, welche Vorinkubationsdauer optimal ist. Ein unblockiertes Ansatzpaar wurde ebenfalls inkubiert und gemessen (siehe **3.1.9**).

Anwendung des optimierten Protokolls mit lipophilen Stimuli: Für diese Stimulation wurde das Protokoll aus **3.1.5** verwendet. Als Stimuli wurde das Lyophilisat von *Mycobacterium tuberculosis* in PBS, EtOH oder DMSO rekonstituiert. Von diesen Lösungen wurden jeweils die Volumenmengen zupipettiert, die für eine Endkonzentration von 5 µg/ml nötig waren. Die Stimulation erfolgte für ein oder vier Tage ohne jegliche Blockierung. Die parallel angesetzten Kontrollen enthielten jeweils die gleiche Menge an Lösungsmittel (siehe **3.1.10**).

Stimulationsansatz mit Peptiden des TT: Es war auch möglich Th-Zellen durch Peptide zu stimulieren. Zur Erprobung wurden insgesamt vier Peptide aus der Sequenz des TT (TTP1 bis TTP4) als Stimuli verwendet. Das optimierte Stimulationsprotokoll wurde mit jeweils 20 µg/ml der einzelnen Peptide durchgeführt. Zum Vergleich wurde ein weiterer Ansatz mit allen vier Peptiden, ein Ansatz mit 5 µg/ml TT, ein Ansatz mit TT und den vier Peptiden und eine unstimulierte Kontrolle (H₂O mit 20 % DMSO) angesetzt. Nach 26 h wurden die Zellen geerntet und gefärbt (siehe **3.1.11**).

Danach wurde mit dem Peptid TTP1 eine Konzentrationskurve erstellt. Die Proben wurden mit 5, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg TTP1 pro ml Ansatz versetzt und für 26 h inkubiert. Die Kontrolle entsprach der oben angegebenen (siehe **3.1.12**).

Abgerundet wurde die Optimierung der Peptidstimulation durch eine Kinetik: Hierfür wurden die Ansätze mit je 40 µg/ml TTP1 stimuliert und nach Ablauf von 2, 4, 6, 8, 10, 24, 26, 28 und 30 h Inkubationszeit geerntet und gefärbt. Die Kontrollen (H₂O mit 20 % DMSO) wurden jeweils neu geerntet und gemessen (siehe **3.2.3**).

Stimulationsansatz mit Peptiden der GAD: Das optimierte Stimulationsprotokoll für TT-Peptide wurde in **3.3.1** zur Aktivierung GAD-spezifischer T-Lymphozyten verwendet. Die Blutproben von vier IDDM-Patienten wurden mit den Peptiden TTP1, GP01 bis GP11 und NCP (je 40 µg/ml) für einen bis fünf Tage inkubiert. Neben der Lösungsmittelkontrolle wurde der TTP1-Ansatz als Positivkontrolle und

der NCP-Ansatz als Negativkontrolle angesetzt. Da auch Zytokine gefärbt wurden, erfolgte 4 h vor der Ernte die Sekretionsblockierung mit BFA.

In einer zweiten Kinetik unter **3.3.2** wurden die Proben von vier weiteren IDDM-Patienten für drei oder vier Tage stimuliert, um den optimalen Stimulationszeitraum zu ermitteln. Das Protokoll wurde dabei nicht verändert, lediglich eine HLA-Typisierung wurde bei den Patienten durchgeführt, um die Spezifität der Stimulation zu testen (siehe **2.2.6**).

Die Stimulation für drei Tage mit den gleichen Peptiden wurde schließlich an vier HLA-typisierten gesunden Kontrollpersonen identisch durchgeführt und diese Ergebnisse mit denen der IDDM-Patienten verglichen (siehe **3.3.3**).

2.2.2 Methoden zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen und anderer Leukozyten mit niedriger Frequenz

Parallel zur Optimierung des Stimulationsansatzes erfolgten auch Experimente zur verbesserten Detektion antigenspezifischer T-Zellen und anderer seltener Leukozyten durch das DFZ.

Färbung aktivierter T-Zellen in Vollblut: Das anfangs verwendete Färbeprotokoll zur Identifizierung der T-Lymphozyten und ihrer Aktivierung wurde in **3.1.1** bis **3.1.5** wie folgt durchgeführt: Nach mehrmaligen Resuspendieren wurden je 100 µl der inkubierten Blutproben in ein Probenröhrchen überführt. Dazu wurden jeweils 3 ml FACS-Lysing solution gegeben, mit den Proben vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Lösung bewirkt zum einen das Zerplatzen der Erythrozyten mittels hypotonischen Schocks und zum anderen die Fixierung der Leukozyten durch Paraformaldehyd.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze für 5 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm), was 425 g entspricht, zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Anschließend wurden die lysierten Proben in 500 µl FACS-Permeabilizing solution vorsichtig resuspendiert und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Die FACS-Permeabilizing solution fixiert ebenfalls die Zellen und ermöglicht durch porenbildende Substanzen den Zugang zu intrazellulären Antigenen ohne dass die Zellen zerplatzen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Permeabilisierung durch die Zugabe von 3 ml PBS mit 0,5 % BSA gestoppt und die Ansätze bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf ca. 300 µl abgesaugt und die fluoreszenzmarkierten Antikörper zupipettiert; das optimale Volumen beträgt je nach Antikörper

zwischen 5 und 20 µl. Die Färbung erfolgte für 30 min auf Eis in Dunkelheit. Abschließend wurden die Ansätze mit der nochmaligen Zugabe von je 3 ml PBS/0,5 % BSA und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm gewaschen. Der Überstand wurde auf ca. 400 µl Restvolumen abgesaugt und die Proben im DFZ gemessen (siehe **2.2.4**).

Die Färbung der T-Zellen erfolgte mit farbstoffmarkierten Antikörpern gegen CD3 und CD8, womit die T-Zellen selbst und die beiden großen T-Zellsubpopulationen der CTLs und Th-Zellen identifiziert werden können. Pro Probenröhrchen wurden zwei Aktivierungsmarker oder Zytokine gefärbt. Die Aktivierungsmarker waren CD25, CD69, CD71, CD134, CD152 und CD154. An Zytokinen wurden IFN- γ und IL-2 gefärbt (siehe **1.3.1**). Die Kombination der Antikörper wurde im Verlauf der Optimierungsschritte geändert.

Optimierung des Färbeprotokolls: Das bisher verwendete Protokoll wurde durch die schwachen Signale der intrazellulär gefärbten Zytokine infrage gestellt. In **3.1.6** wurde verdünntes Vollblut (Anteil 33 %) mit TT (5 µg/ml) für 28 h stimuliert und ein Teil der Ansätze mit 10 µg/ml BFA 4 h vor der Ernte blockiert. Der andere Teil der Ansätze wurde nicht blockiert; eine PBS-Kontrolle wurde ebenfalls angesetzt. Die Proben wurden zu je 100 µl pro Probenröhrchen aufgeteilt, nach drei verschiedenen Protokollen gefärbt (T-Zellen: CD3 und CD8, Aktivierungsmarker: CD25, CD69, CD152 und CD154) und danach im DFZ gemessen.

Bei der reinen Extrazellulärfärbung wurden die Antikörper direkt in die geernteten Ansätze pipettiert und die Färbung für 30 min bei RT in Dunkelheit durchgeführt. Es folgte die Lyse/Fixierung mit 3 ml FACS-Lysing solution (10 min bei RT in Dunkelheit) und der Waschschrift mit 3 ml PBS/0,5 %BSA (1500 rpm für 5 min).

Die simultane Färbung entsprach der bisherigen Färbemethode wie oben.

Demgegenüber war die sequenzielle Färbung eine Fusion der beiden vorherigen Protokolle: Zuerst erfolgte die extrazelluläre Färbung der Aktivierungs- Und Oberflächenantigene für 30 min bei RT in Dunkelheit. Danach wurden die Ansätze mit 3 ml FACS-Lysing solution lysiert/fixiert (10 min bei RT) und zentrifugiert (1500 rpm für 5 min). Nach dem kompletten Absaugen des Überstands folgte die Resuspendierung in 500 µl FACS-Permeabilizing solution und die Permeabilisierung für 10 min bei RT in Dunkelheit. Nach der Zugabe von je 3 ml PBS/0,5 % BSA, der Zentrifugation (1550 rpm für 5 min) und dem Absaugen des

Überstandes wurden erneut die Antikörper gegen die Aktivierungsmarker zugegeben. Die intrazelluläre Nachfärbung erfolgte für 30 min auf Eis in Dunkelheit. Abschließend wurden die Proben mit 3 ml PBS/0,5 %BSA gewaschen und der Überstand auf ca. 400 µl abgesaugt.

Das sequenzielle Färbeprotokoll wurde in den nachfolgenden Versuchen von **3.1.7** bis **3.3.3** ausschließlich verwendet.

Erweiterung des Färbepanels für TT-reaktive TT-Zellen: Im Zuge einer weiteren Charakterisierung der aktivierten T-Zellen in **3.2.1** bis **3.2.3** wurden diese nach dem Protokoll der sequenziellen Färbung mit Antikörpern gegen CD3, CD45R0 und CD62L gefärbt. Als Aktivierungsmarker wurden CD25, CD69, CD134 und CD154 untersucht.

Färbung GAD-spezifischer (T)-Lymphozyten: Zur Detektion GAD-reaktiver Lymphozyten in **3.3.1** wurden diese mit dem sequenziellen Protokoll auf die Antigene CD4 oder CD45RA gefärbt. In **3.3.2** und **3.3.3** wurden hingegen die T-Lymphozyten mittels CD3- und CD45R0-Antikörper identifiziert und differenziert. Die Aktivierung wurde durch die Färbung von Aktivierungsmarkern (CD25 und CD134) und Zytokinen (IFN- γ und IL-10) detektiert, deren Kombination jeweils angepasst wurde.

Färbung CMV-spezifischer CTLs mittels HLA-Tetrameren: Die untersuchten fünf Blutproben wurden fixiert (Transfix-Puffer) und über Nacht verschickt. Am nächsten Tag wurden 100 µl Vollblut im Probenröhrchen mit den jeweils vorgegebenen Mengen an HLA-Tetrameren und Antikörpern gegen CD3, CD8 und CD57 für 30 min bei RT in Dunkelheit gefärbt. Die verwendeten HLA-Tetrameren waren vier rekombinant hergestellte MHC-I-Moleküle, die mit dem CMV-Peptid pp65 beladen, zu einem Tetramer verknüpft und mit einem Fluorochrom konjugiert wurden (siehe **1.2.5.2**). Nach der Inkubation wurde zu den Ansätzen je 3 ml Ortho-mune lysing reagent pipettiert und die Lyse für 15 min bei RT in Dunkelheit durchgeführt. Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (1500 rpm für 5 min), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 3 ml PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Es folgten eine weitere Zentrifugation (1500 rpm für 5 min), das Absaugen des Überstandes auf ca. 400 µl Restvolumen und die Messung im DFZ. Jede erhaltene Blutprobe wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen gefärbt und gemessen (siehe **3.2.4**).

Färbung seltener Leukozyten im Vollblut: In **3.5.1** und **3.5.2** wurden die gesuchten NK-T-Zellen oder DCs über eine einfache Vollblutfärbung detektiert.

Dazu wurden die entsprechenden Antigene direkt in der Blutprobe für 30 min bei RT in Dunkelheit mit fluorchromkonjugierten Antikörpern dekoriert (NK-T-Zellen: CD3, CD4, CD8 und V α 24; DCs: Lin-1, CD1c, CD1d, HLA-DR und CD11c). Es folgte die Zugabe von 3 ml FACS-Lysing solution und die Inkubation für 10 min bei RT in Dunkelheit. Nach der Zentrifugation der lysierten Ansätze für 5 min bei 1500 rpm wurden sie mit 3 ml PBS/0,5 %BSA gewaschen und anschließend im DFZ gemessen.

Methoden der Zellzählung: Für die Zählung der Leukozyten in den Versuchen von **3.4.1** bis **3.4.4** und **3.5.2** wurden jeweils ca. 500 μ l der Proben im Hämatologie-instrument ADVIA120 nach dem Protokoll des Herstellers gemessen.

Die Zellzahlbestimmung in **3.2.4** wurde mithilfe von fluoreszenten Latexpartikeln, sog. Beads, durchgeführt. Dazu wurden möglichst genau 50 oder 100 μ l Vollblut mit einer definierten Anzahl dieser Beads zusammenpipettiert. Es folgte die Färbung der Antigene CD3, CD4, CD8 und CD45 mit farbstoffmarkierten Antikörpern für 30 min bei RT in Dunkelheit. Anschließend wurde zu den Ansätzen jeweils 3 ml Ortho-mune lysing reagent gegeben und diese für 15 min bei RT in Dunkelheit lysiert. Die Proben wurden ohne Waschschrift innerhalb einer Stunde im DFZ gemessen.

2.2.3 Methoden zur Induktion und Detektion der T-Zell-Apoptose

Separation der peripheren Blutleukozyten (PBLs): Heparinisiertes Vollblut von Kontrollpersonen oder Patienten wurde nach der Entnahme zur Abtrennung der Erythrozyten auf das gleiche Volumen einer Ficoll-Schicht gegeben und etwa 1 h bei RT stehen gelassen. Durch Wechselwirkungen der Erythrozyten mit dem geladenen Polymer Ficoll kam es zu einer Verklumpung und Absinken dieser auf den Boden des Inkubationsröhrchens. Die Abtrennung wurde als abgeschlossen betrachtet, wenn die obere Schicht ihre rote Farbe verloren hatte und die Erythrozyten quantitativ abgesunken waren. Der Überstand mit den PBLs wurde abpipettiert, in ein neues Reaktionsröhrchen überführt, mit ca. 3 ml RPMI1640 verdünnt und für 7 min bei 1200 rpm (= 272 g) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen erneut in RPMI1640 resuspendiert, wie vorher zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Abschließend wurden die PBLs in ca. 1 ml RPMI1640 mit 10 % Humanserum (HS) aufgenommen.

Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung im Hämatologieinstrument ADVIA120 nach dem Protokoll des Herstellers. Danach wurden die PBLs auf 1 - 2 Millionen pro ml Zellkulturmedium (RPMI1640 mit 10 % HS) verdünnt.

Inkubationsprotokolle: Die Induktion der Apoptose erfolgte mit verschiedenen Reagenzien. In allen Versuchen wurden die Reagenzien nach der Einstellung der Zelldichte zugegeben und die Ansätze im Brutschrank bei 37 °C feuchter Wärme und 5 % CO₂ inkubiert. Die Reagenzien und ihre Konzentrationen für die Versuche aus **3.4.1** und folgende wurden in Tab. 2.6 zusammengestellt.

Reagenz	Konzentration
DMSO	1,1 mg/ml
2-Chloradenosin	3,02 µg/ml
2-Chloro-2'-deoxyadenosin	285,7 ng/ml
PMA	25 ng/ml
Ionomycin	1,1 mg/ml
Methotrexat	4,54 µg/ml
2-Deoxy-D-ribose	1,34 mg/ml
Staurosporin	233,3 µg/ml

Tab. 2.6: Reagenzien und verwendete Konzentrationen

Das Methotrexat wurde 4 h nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin zugegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24, 48 oder 72 h Inkubationsdauer.

Die Anzahl der Apoptose-Induktoren wurde in **3.4.2** auf drei gekürzt. Neben dem Kontrollansatz mit DMSO wurden die Zellen entweder mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin oder 2-Deoxy-D-ribose oder Staurosporin in den angegebenen Konzentrationen der Tab. 2.6 für 24 oder 48 h inkubiert.

In **3.4.3** wurden die PBLs nur noch mit DMSO oder 2-Deoxy-D-ribose in den gegebenen Konzentrationen (siehe Tab. 2.6) versetzt und für 48 h im Brutschrank angesetzt.

Dagegen wurde in den Proben von **3.4.4** die Apoptose der PBLs durch die Gabe von 5 µg CD95-Antikörper pro ml Ansatz induziert; zu den Kontrollen wurde PBS gegeben. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24 oder 48 h Inkubation.

Färbeprotokolle zur Detektion apoptotischer T-Zellen: Die Ansätze wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, und je 300 µl Zellsuspension wurden pro Färbung in ein Probenröhrchen überführt. In allen Versuchsblöcken

(**3.4.1** bis **3.4.4**) wurden die apoptotischen T-Zellen identifiziert. Dafür wurden die Proben mit den entsprechenden Mengen an Annexin V, das spezifisch an PS bindet, und Anti-CD3 für 20 min bei RT in Dunkelheit gefärbt. Anschließend wurden die Ansätze mit je 3 ml Kalziumhaltigen PBS vermischt und für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ca. 400 µl abgesaugt und zum Restvolumen ca. 1 µg/ml PI pipettiert. Das PI penetriert in den Kern von Zellen, deren Integrität der Plasmamembran zerstört ist und ermöglicht so die Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Messung im DFZ erfolgte ohne weiteren Waschschrift [402].

Für die Färbung der T-Zellen mit JC-1 in **3.4.3** und **3.4.4** wurden zu den 300 µl der vorgelegten Zellsuspension 1,5 µg des Farbstoffes JC-1 und 0,4 µg eines APC markierten und azidfreien CD3-Antikörpers pipettiert. Die Färbung wurde für 15 min bei RT in Dunkelheit durchgeführt. JC-1 penetriert in die Mitochondrienmatrix und liegt dort in Abhängigkeit des Protonengradienten als Aggregat oder Monomer vor. Die Aggregate beim intakten Gradienten fluoreszieren in einer anderen Wellenlänge als die Monomeren beim zerstörten Gradienten. Danach wurden 3 ml kalziumhaltiger PBS zugegeben, die Ansätze für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand auf 400 µl Restvolumen abgesaugt. Es folgte die Messung im DFZ [67; 68].

Die Antigene Bcl-2 und CD3 wurden in den Versuchen von **3.4.2** bis **3.4.4** nach dem sequenziellen Protokoll ohne Lyse durchgeführt. Dazu wurden 300 µl der Zellsuspension im Probenröhrchen mit Anti-CD3 für 30 min bei RT in Dunkelheit gefärbt. Nach der Zentrifugation (1200 rpm für 7 min) wurde der Überstand vollständig abgesaugt und die Zellen in 500 µl FACS-Permeabilizing solution resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei RT in Dunkelheit und wurde durch die Zugabe von 3 ml PBS/0,5 % BSA gestoppt. Nach der Zentrifugation (1500 rpm für 5 min) wurde der Überstand auf 400 µl abgesaugt und der Antikörper gegen Bcl-2 zugegeben. Der Färbung (30 min in Dunkelheit auf Eis) folgte der Waschschrift mit 3 ml PBS/0,5 % BSA, das Absaugen des Überstandes auf ca. 400 µl Restvolumen und die Messung im DFZ.

Desweiteren wurden in **3.4.2** und **3.4.4** Ceramid, CDw17 (Lactoceramid), CD65s (Polysialyl-N-Acetyllactoceramid) und CD77 (Globotriacylceramid) mittels reiner Extrazellulärfärbung detektiert. Die entnommenen 300 µl Zellsuspension wurden mit den Antikörpern für 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Dem Waschschrift mit 3 ml PBS/0,5 % BSA (Zentrifugation bei 1200 rpm für 7 min) folgte die

Sekundärfärbung von Ceramid und CD77 mit Goat anti mouse oder Goat anti rat für weitere 30 min bei RT in Dunkelheit. Anschließend wurden 3 ml PBS/0,5 % BSA zugegeben und die Proben für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Restvolumen von ca. 400 µl im DFZ gemessen.

2.2.4 Durchflussszytometer (DFZ)

2.2.4.1 Flüssigkeitssystem des DFZ

Die Grundlage aller Messungen von Zellen im DFZ ist, dass die Zellen einzeln in Suspension vorliegen. Die Zellen werden aus dem Probenröhrchen über die Probennadel angesaugt und gelangen als Probenstrahl, der einen Durchmesser von 20 µm hat, ins Gerät. Dort wird der Probenstrom im Hüllstrom (aus FACS-Flow) aufgenommen. Mittels hydrodynamischer Fokussierung werden die Zellen vereinzelt, beschleunigt und passieren in einem laminaren Fluss nacheinander die Quarküvette. In dieser gelangen sie zuerst durch den roten und danach durch den blauen Laserstrahl, was zur Anregung der fluoreszenten Moleküle führt. Schließlich werden die Zellen in einen Abfallbehälter geleitet, in dem sie durch Chlorbleiche abgetötet werden [34].

2.2.4.2 Optisches System und Datenverarbeitung

Das optische System und das Prinzip der Detektion farbstoffmarkierter Zellen sollen anhand Abb. 2.1 anschaulich gemacht werden. Eine detailliertere Beschreibung der Prinzipien des DFZ und der gemessenen Signale sind unter [347] zu finden.

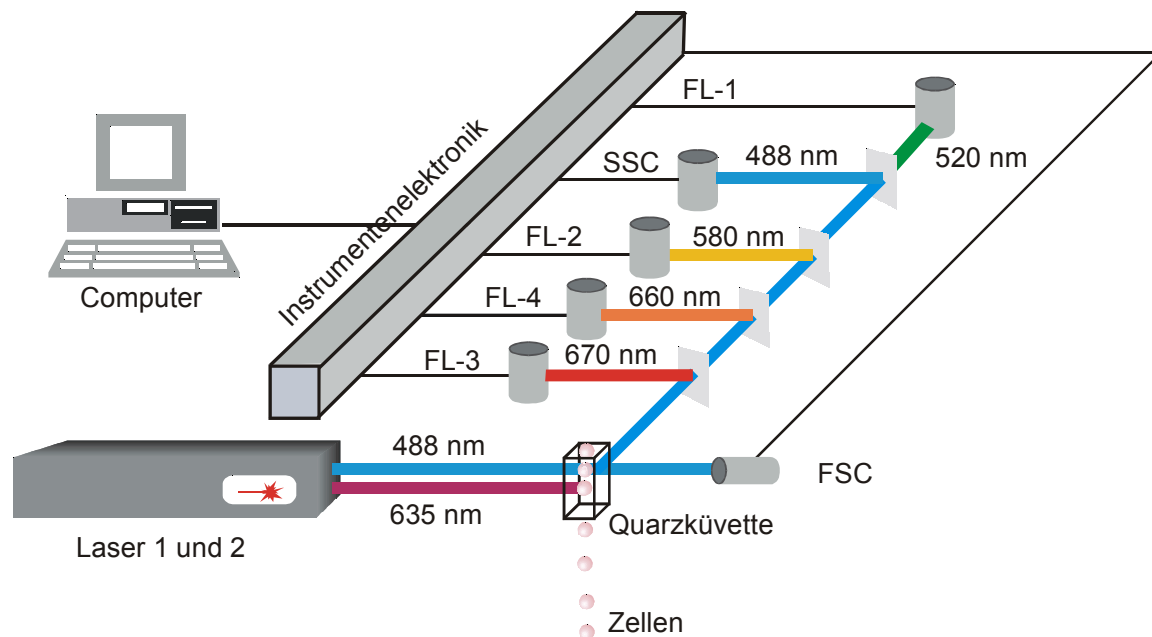


Abb. 2.1: Aufbau des Durchflusszytometers

Die zur Anregung der fluoreszenten Moleküle verwendeten zwei Laser emittieren monochromatisches Licht in der Wellenlänge 488 und 635 nm. Der blaue Laser ist mit Argon gefüllt und liefert eine konstante Leistung von 15 mW. Dagegen ist der rote Laser ein Diodenlaser, dessen Leistung und Wellenlänge nicht absolut konstant gehalten werden. Die Strahlen werden vor der Quarzküvette durch eine Fokussierungslinse gebündelt und haben einen Durchmesser von 5 – 10 μm .

Auf der direkten Linie des blauen Lasers liegt die Fotodiode des Vorwärtstreulichts (FSC) hinter einer Blende, die das direkte Laserlicht absorbiert. Die Fotodiode des FSC detektiert das Streulicht jenseits des Blendendurchmessers. Das von den Zellen im rechten Winkel zum Laserstrahl emittierte Seitwärtsstreu- und Fluoreszenzlicht (SSC und FL-1 bis FL-4) wird von einer weiteren Linse gebündelt und über dichroitische Spiegel auf fünf Lichtverstärkerröhren (PMTs) verteilt. Dabei lassen die Spiegel das Licht in einem definierten Wellenlängenbereich passieren und reflektieren das Licht anderer Wellenlängen. Die Ausstattung der PMTs mit Filtern (bandpass oder longpass) limitiert den Wellenbereich das einfallenden Signals zusätzlich ($\Delta = 40 \text{ nm}$ oder weniger).

Die eingetroffenen Lichtblitze werden von den PMTs in elektrische Signale umgewandelt und diese an die Instrumentenelektronik weitergegeben. Diese integriert die einzelnen Signale, rechnet die Kompensationswerte ein und ordnet die gemessenen Werte jeder einzelnen Zelle zu [34].

Die pro Zelle maximal gemessenen 7 Parameter (FSC, SSC, FL-1 bis FL-4 und Zeit) werden an den Steuercomputer weitergegeben. Der Computer kann während der Messung die bisher erfassten Ereignisse darstellen und speichert nach dem Ende der Messung die Ereignisse samt Bezeichnungen und Instrumenteneinstellungen in eine sog. List mode-Datei. Zur Zellmessung und zur Steuerung des DFZ wurde die CELLQuest-Software verwendet [33].

2.2.4.3 Gemessene Parameter: FSC und SSC

FSC und SSC können unabhängig von einer Färbung der Zellen mit fluorchrom-konjugierten Antikörpern oder anderen Farbstoffen detektiert werden, da auch ungefärbte Leukozyten bei Bestrahlung mit dem blauen Laser Licht emittieren. Die Ursache sind fluoreszierende Bestandteile von Proteinen (z. B. Flavine) im Zytosol der Zellen.

Das Signal des FSC ist abhängig von der Größe der Zellen, weshalb dieser Parameter dazu benutzt wird, die Zellen von Zelltrümmern und anderem Debris abzutrennen. Dies geschieht, indem man einen sog. Threshold auf den FSC legt, und alle Ereignisse ausblendet, die den eingestellten Wert unterschreiten. Diese Ereignisse werden weder gemessen noch abgespeichert. Die durchgeführten Messungen hatten einen Threshold von 52 respektive 100 auf einer Skala von 0 bis 1024. In den Messungen aus **3.2.4** musste der Threshold auf FL-3 gelegt werden, da der Durchmesser der Beads (ca. 10 µm) kleiner war als der Durchmesser der Zellen (ca. 20 µm). In diesem Fall wurden alle Partikel unterdrückt, die kein Fluoreszenzsignal emittierten.

Im Gegensatz zum FSC ist der Parameter SSC von der Granularität und der Oberflächenstruktur der Zelle bestimmt. Das Signal steigt an, je heterogener die gemessene Zelle ist.

Die Messung von FSC und SSC während des Laufs ergibt bei linearer Darstellung des FSC in horizontaler Richtung und des SSC in vertikaler Richtung eine Möglichkeit die gemessenen Proben grob zu charakterisieren (siehe Abb. 2.2). Da sich das FSC/SSC-Diagramm in Abhängigkeit der Probenbearbeitung ändert, ist immer eine Anpassung der FSC/SSC-Einstellungen nötig. Die Veränderung der Empfindlichkeit von FSC und/oder SSC ermöglicht es auch auf eine bestimmte Zellpopulation zu fokussieren. Dies kann bei der anschließenden Auswertung der Messdaten noch verfeinert werden (siehe **2.2.5**).

2.2.4.4 Gemessene Parameter: FL-1 bis FL-4

Der Einsatz von vier verschiedenen Antikörpern, gekoppelt an unterschiedlichen Fluorochromen, ermöglicht eine gleichzeitige Messung der gebundenen Epitope im DFZ. Die verwendeten Fluorochrome FITC, PE, PerCP und CyChrome absorbieren das Licht des blauen Argon-Lasers, während APC lediglich durch den roten Diodenlaser angeregt wird.

Bei allen Fluorochromen kommt es nach der Absorption der Lichtenergie zu einer Anregung der Farbmoleküle, die sofort in den Ausgangszustand zurückfällt. Die Folge ist die Emission von Photonen mit einer geringeren Energie, was der Fluoreszenz mit einer längeren Lichtwellenlänge entspricht. Dieser sog. Stokes' shift fällt bei den Farben verschieden aus (FITC: 519 nm, PE: 578 nm, PerCP: 675 nm, CyChrome: 670 nm und APC: 660 nm). Die Auftrennung der einzelnen Signale erfolgt über das beschriebene optische System [34].

Die Wechselwirkung von PI mit der DNA der Zelle ergibt ein Signal, das in FL-2 und FL-3 detektiert wird. Daher wurde PI nur mit FITC und APC kombiniert.

Der Farbstoff JC-1 strahlt als Aggregat im Bereich von 590 nm, das in FL-2 detektiert wird. Dagegen fluoreszieren die Monomeren im Bereich von 530 nm, was man in FL-1 messen kann. JC-1 wurde nur mit APC-konjugierten Antikörpern kombiniert, und die Zellmessung erfolgte ohne die unter **2.2.4.5** beschriebenen Kompensationseinstellungen.

2.2.4.5 Kalibration des DFZ

Da die vier Fluoreszenzsignale Überlappungen in den Emissionsspektren haben, müssen die Überschneidungen aus den Signalen der einzelnen PMTs herausgerechnet werden. Diese sog. Kompensation der Fluoreszenzen, die einer Subtraktion der Werte voneinander entspricht, wurde von der Geräteelektronik nach der Messung durchgeführt.

Die Höhe der Kompensationswerte wird mittels Kalibration bestimmt. Dazu werden CaliBRITE-Beads mit der FACSCComp-Software gemessen und sowohl die Höhe der PMT-Verstärkung als auch die Prozentwerte der Kompensationseinstellung ermittelt. Außerdem wird eine Kalibration der Zeitverzögerung durchgeführt, mit der bestimmt wird, wieviel Zeit ein Bead-Partikel für den Durchlauf der beiden Laserstrahlen in der Quarzküvette benötigt.

Die Kompensationswerte wurden an einzel gefärbten T-Zellen überprüft und gegebenenfalls nachgestellt. Eine regelmäßige Wiederholung der Kalibration

minimiert die Gefahr der Falschmessung infolge einer Veränderung der PMT-Eigenschaften oder der Probenstrahlgeschwindigkeit [35].

2.2.5 Auswertung der Messdaten

Die für die jeweilige Fragestellung inkubierten und gefärbten Zellen wurden mit den entsprechenden Kompensationseinstellungen gemessen, bis eine vorher definierte Anzahl von Gesamtereignissen respektive Zielzellen gezählt wurde. Nach Erreichen dieser Anzahl wurde die Messung gestoppt und als List mode-Datei auf dem Computer gespeichert. Die Auswertung dieser Messdateien erfolgte mithilfe der Attractors oder CELLQuest-Software durch eine hierarchische Annäherung an die Zielzellen, das sog. Gating [32; 33].

Identifizierung der T-Lymphozyten: Als erster Schritt wurde ein FSC/SSC-Diagramm (FSC/SSC-dot plot) erstellt und die Zellen vom Debris getrennt (siehe Abb. 2.2). Zwar ermöglicht der Threshold bereits ein Ausblenden eines großen Teils des Debris, jedoch gelingt dies nicht vollständig. Darüber hinaus werden Zellen erfasst, die nicht weiter ausgewertet werden, aber zur Beurteilung der Probenqualität erforderlich sind. Die farbigen Punkte im niedrigen SSC-Bereich der Abb. 2.2 repräsentieren jeweils eine der detektierten Zelle, die in den folgenden Auswerteschritten weiter berücksichtigt werden. Der FSC/SSC-dot plot zeigt darüber hinaus, dass die Zellen in sog. Clustern liegen, da gleiche Zelltypen weitgehend dieselben FSC/SSC-Eigenschaften haben.

In der Auswertung der Messungen in **3.3.1** wurden die Lymphozyten auf diese Weise identifiziert. In allen anderen Versuchen und Auswertungen von **3.1.1** bis **3.5.1** wurden die T-Zellen direkt gefärbt und identifiziert.

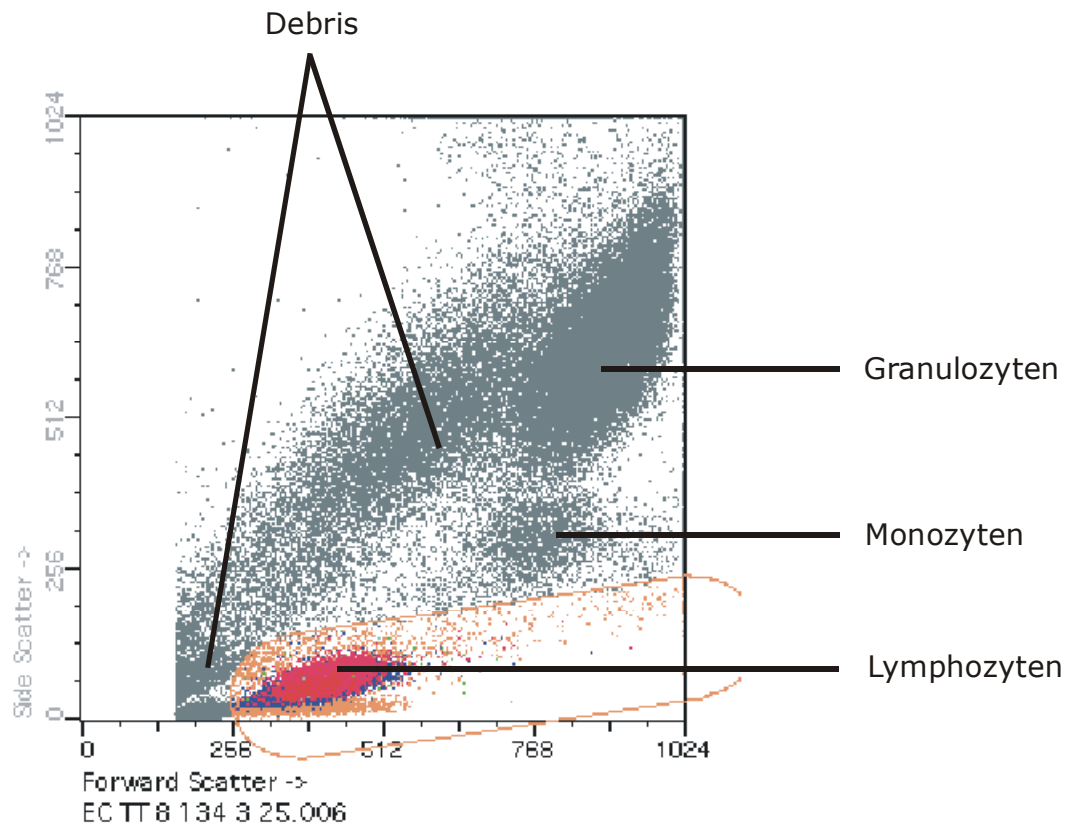


Abb. 2.2: FSC/SSC-dot plot

In der zweiten Stufe der Auswertung wurden die T-Lymphozyten über das Signal des CD3-Antikörpers detektiert. Nur T-Lymphozyten besitzen dieses Epitop und können mit lediglich einem fluorochromkonjugierten Antikörper angefärbt und von allen anderen Leukozyten separiert werden. Die Identifikation erfolgte im SSC/CD3-dot plot (siehe Abb. 2.3). Die orange dargestellten Ereignisse liegen im Cluster der T-Lymphozyten und sind hauptsächlich CD3-negative B-Lymphozyten und NK-Zellen.

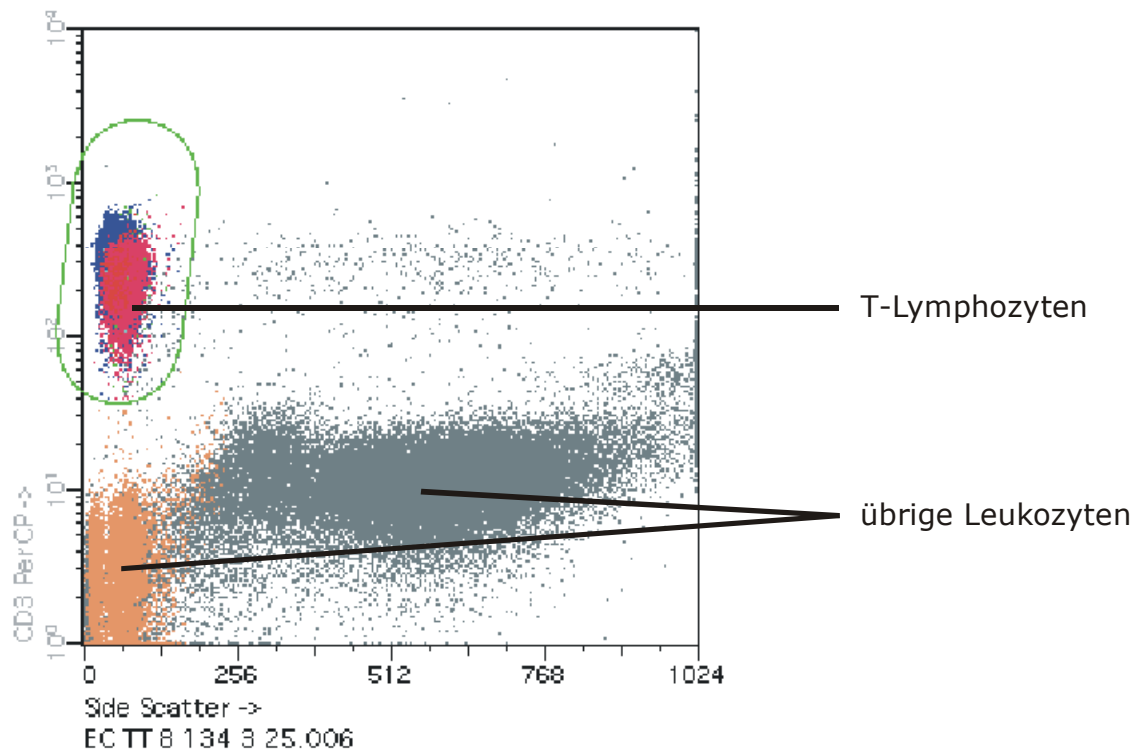


Abb. 2.3: SSC/CD3-dot plot

Identifizierung TT-reaktiver Th-Zellen und CTLs: In der weiteren Auswertung der Versuche **3.1.1** bis **3.2.1** wurden nur Ereignisse berücksichtigt, die CD3-positiv waren und einen niedrigen SSC aufwiesen. Die T-Lymphozyten wurden aufgrund ihres CD8-Signals differenziert. Die Abb. 2.4 zeigt einen CD3/CD8 dot plot mit drei erkennbaren T-Zellsubpopulationen (CD8 stark positiv, schwach positiv und negativ). Von diesen wurden nur die beiden dominanten weiter ausgewertet (rot und blau dargestellt). Im Bereich der orangen Ereignisse sind die ebenfalls CD8 positiven, aber CD3 negativen NK-Zellen zu sehen.

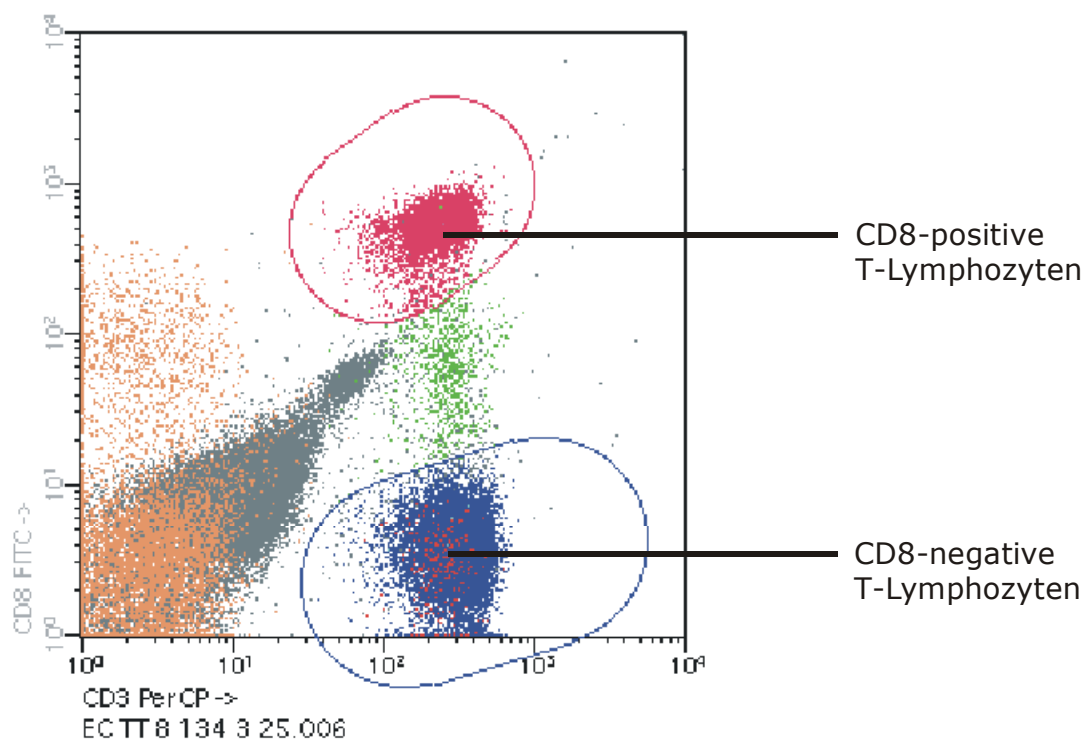


Abb. 2.4: CD3/CD8-dot plot

In der weiteren Charakterisierung wurde die Expression von zwei Aktivierungsantigenen auf respektive in den beiden T-Zellsubpopulationen der CTLs ($CD3^+/CD8^+$) und der Th-Zellen ($CD3^+/CD8^-$) untersucht. Für die gemessenen Lösungsmittelkontrollen wurden die Bereiche der antigenpositiven Zellen so eingestellt, dass jeweils ca. 0,2 % der Th-Zellen oder der CTLs positiv für das Aktivierungsantigen war. Die Einstellungen wurden beibehalten und der TT-stimulierte Ansatz zum Vergleich geladen und ausgewertet. Generell wurde dann von einer Stimulation gesprochen, wenn der Anteil der antigenpositiven Th-Zellen oder CTLs bei 1 % oder darüber lag. Dies entsprach der fünffachen Anzahl von Ereignissen im definierten Bereich.

In Abb. 2.5 wurde die Expression des Aktivierungsantigens CD25 auf den CD8 positiven und negativen TT-stimulierten T-Lymphozyten im CD8/CD25-dot plot dargestellt.

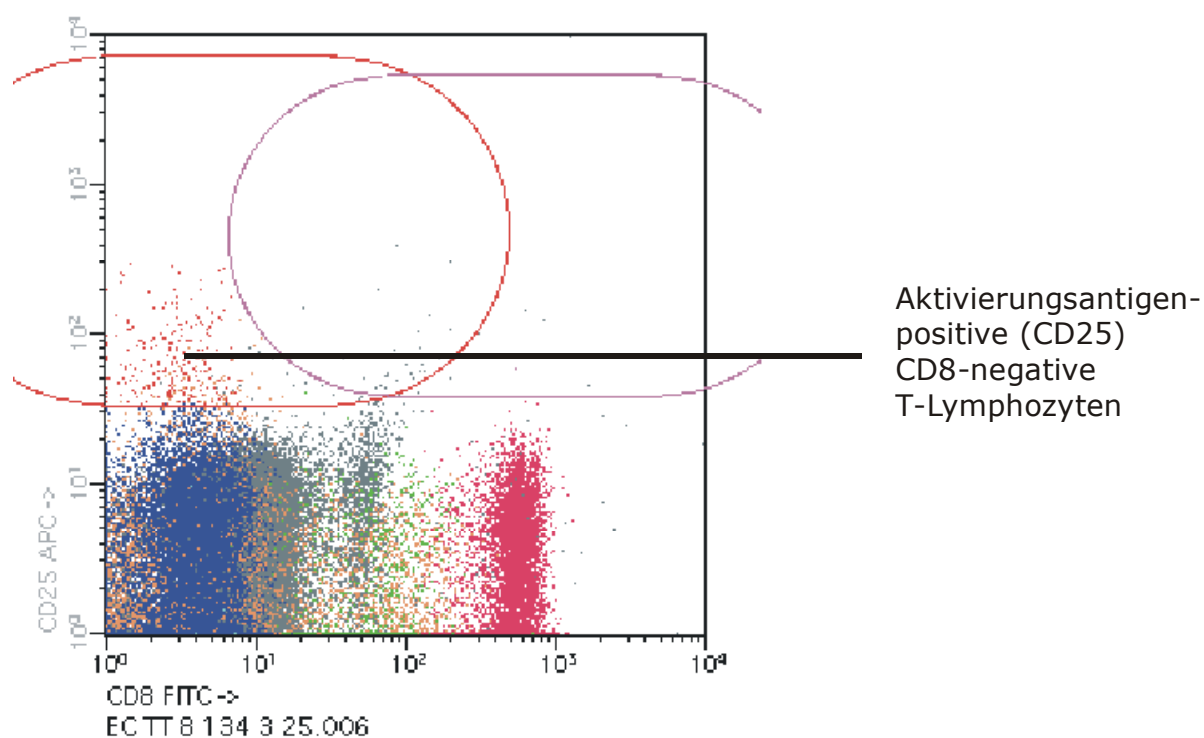


Abb. 2.5: CD8/CD25-dot plot

Identifizierung der NK-T-Zellen: In diesem Auswerteschema der Färbung aus **3.5.1** wurden die T-Zellen wie oben identifiziert und mittels CD4- und CD8-Signal in vier Subpopulationen eingeteilt. Die doppelnegative Subpopulation ($CD3^+/CD4^-/CD8^-$) wurde auf ihre Reaktivität gegenüber dem $V_{\alpha}24$ -Antikörper überprüft. Der Prozentwert der $V_{\alpha}24^+$ NK-T-Zellen wurde im Verhältnis zu allen T-Zellen gesetzt und bestimmt.

Charakterisierung reaktiver T-Zellen: Um die antigenspezifischen und reaktiven T-Zellen näher zu charakterisieren wurden diese in den Versuchen **3.1.10**, **3.2.2** und **3.2.3** mit den Antikörpern gegen CD45R0 und CD62L gefärbt. Es konnte lediglich ein Aktivierungsantigen pro Färbung gemessen werden.

Nach der Identifizierung der T-Lymphozyten wie oben wurden sie in einem CD45R0/CD62L-dot plot in vier Subpopulationen eingeteilt. Die Abb. 2.6 zeigt zwei große Populationen im Bereich der $CD62L^+$ T-Zellen ($CD45R0^-$ und $CD45R0^+$). Für das Aktivierungsantigen wurden z. B. im CD25/CD45R0-dot plot für die Lösungsmittelkontrollen 0,2 % der einzelnen Subpopulationen eingestellt und wie oben verglichen. Bei den ereignisschwachen Untergruppen ($CD62L^-$) wurden die Kontrollen entsprechend angepasst.

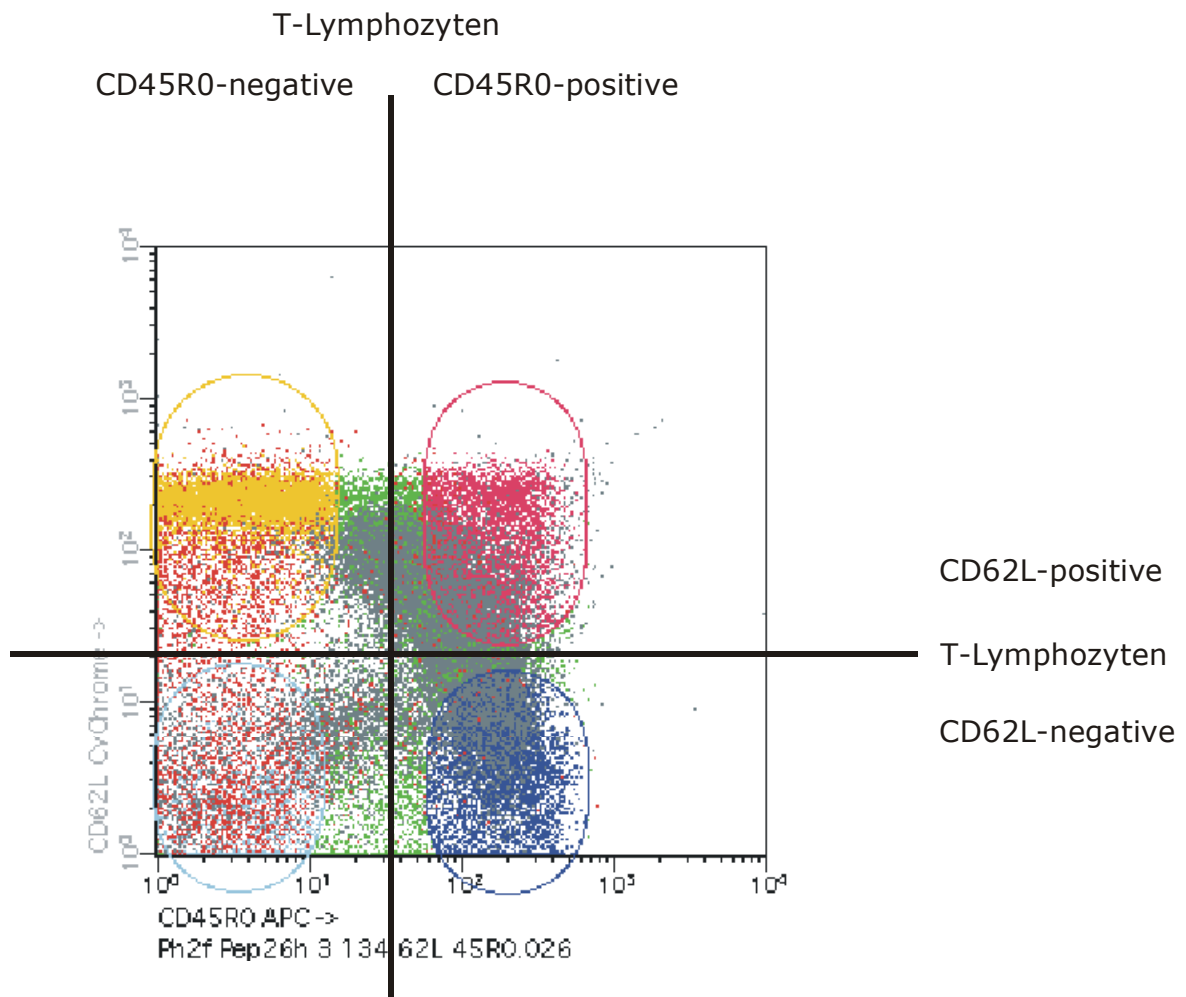


Abb. 2.6: CD45R0/CD62L-dot plot

Charakterisierung GAD-reaktiver T-Zellen: Die Auswertung der Versuche aus **3.3.1** separierte lediglich die Lymphozyten über den FSC/SSC-dot plot von den übrigen Leukozyten. Danach wurden diese im SSC/CD45RA-dot plot oder im SSC/CD4-dot plot in jeweils zwei Untergruppen aufgespalten. Für jede Subpopulation wurden die Lösungsmittelkontrollen wie oben auf 0,2 % positive Zellen für die gemessenen Aktivierungsantigene oder Zytokine eingestellt. Danach wurden die peptidstimulierten Ansätze geladen und ausgewertet.

Bei den nachfolgenden Messung von **3.3.2** und **3.3.3** wurden die gefärbten T-Zellen identifiziert. Es folgte die Unterteilung in CD45R0⁺ und CD45R0⁻ T-Zellen im CD3/CD45R0-dot plot und die Einstellung der Lösungsmittelkontrollen auf 0,2 % positiv für die Aktivierungsantigene und Zytokine bei beiden T-Zellsubpopulationen.

Auswertung CMV-spezifischer CTLs: Gemäß dem EWGCCA-Protokoll für **3.2.4** wurden nach der Identifizierung der T-Lymphozyten nur CTLs mit einem hohen CD8-Signal weiter ausgewertet (siehe Abb. 2.4). In einem CD57/Tetrameren-dot plot wurden die CTLs in 4 Subpopulationen unterteilt. Die Grenze zwischen den jeweils positiven und negativen CTLs wurde zwischen die Fluoreszenzkanäle 100 und 200 gelegt. Es wurde der jeweilige Prozentanteil bestimmt und mit der Anzahl aller CTLs pro µl Vollblut verrechnet.

Charakterisierung apoptotischer T-Zellen: In den Auswertungen der Versuche **3.4.1** bis **3.4.4** wurden zuerst die T-Lymphozyten wie beschrieben identifiziert. Die Grenze Annexin V⁺ T-Zellen wurde im CD3/Annexin V-dot plot bei den sofort gemessenen Proben zwischen den Fluoreszenzkanälen 30 und 100 eingestellt. Danach wurden die inkubierten Lösungsmittelkontrollen und die stimulierten Ansätze geladen und ausgewertet. Das PI-Signal ist in positiven (nekrotischen) Zellen sehr hoch, weshalb die Grenze hier im CD3/PI-dot plot beim Fluoreszenzkanal 5000 lag. Der Vergleich der Messungen erfolgte wie oben.

Die Auswertung der CD3/Bcl-2-Färbung aus **3.4.2** bis **3.4.4** und der Ceramid-Färbungen aus **3.4.2** und **3.4.4** erfolgte analog dem Annexin V im CD3/Bcl-2-dot plot oder im CD3/Ceramid-dot plot. Die Grenzen der jeweils positiven T-Zellen wurden dabei an den unmittelbar gemessenen Proben eingestellt.

Anders verhielt es sich bei JC-1. Nach der Identifizierung der T-Zellen wurden diese in einem FL-1/FL-2-dot plot weiter ausgewertet. Dazu wurde die sofort gemessene Probe geladen, der Bereich mit vitalen (JC-1 orange gefärbten) T-Zellen definiert und die inkubierten Kontrollen bzw. die stimulierten Ansätze geladen und verglichen. Die Abb. 2.7 zeigt die rot dargestellten vitalen T-Zellen mit intaktem Protonengradient in den Mitochondrien. Die grünen Ereignisse sind hingegen T-Lymphozyten, bei denen JC-1 aufgrund des Verlusts des Protonengradienten seine orange Farbe verloren hat.

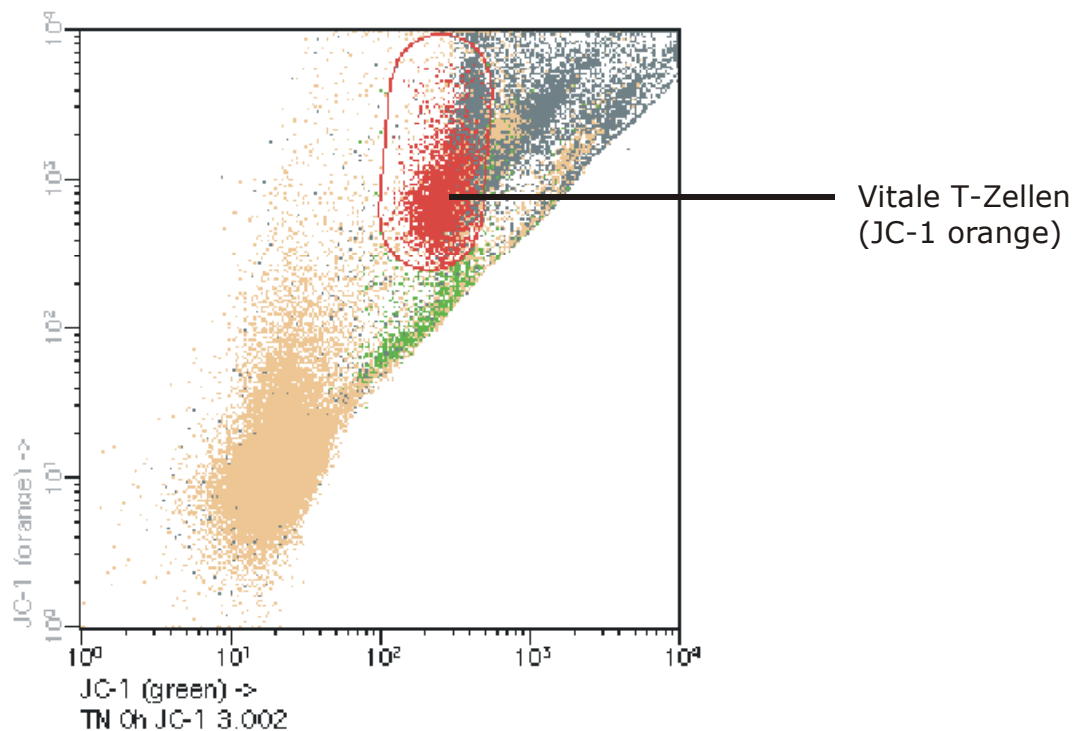


Abb. 2.7: FL-1/FL-2-dot plot

Identifizierung der DCs: In der Analyse der Färbung von **3.5.2** wurden die DCs aufgrund ihres negativen Lin-1- und ihres positiven HLA-DR-Signals identifiziert (siehe Abb. 2.8). Danach wurde der prozentuale Anteil $CD1c^+$ und $CD1d^+$ Blut-DCs bestimmt und die DCs auf ihre Expression von CD11c überprüft. Die DC-Zellzahl pro ml Vollblut wurde durch ihren Prozentanteil an allen Leukozyten (meistens $Lin-1^+$) und durch die parallel erfolgte Leukozytenzählung errechnet.

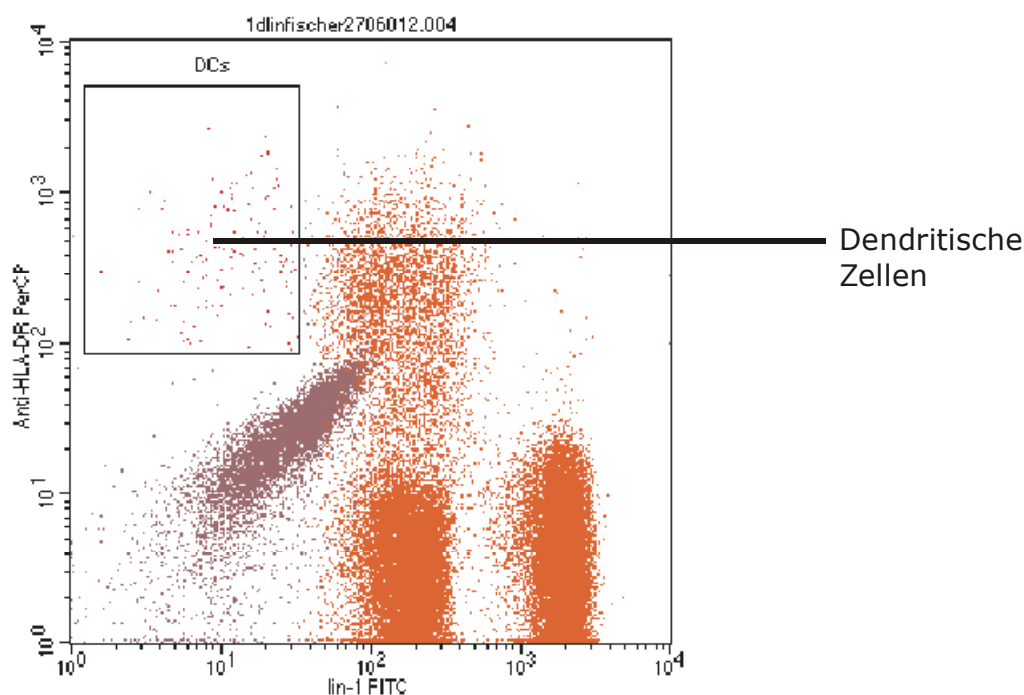


Abb. 2.8: Lin-1/HLA-DR-dot plot

2.2.6 Serologische HLA-Typisierung

Die Bestimmung des HLA-Typs bei Patienten und Kontrollen erfolgte mit der serologischen Methode. Dazu wurden den Personen 20 ml Vollblut in CPDA-Monovetten entnommen und möglichst frisch für 10 min bei 2500 rpm (= 1180 g) ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde das leukozytenreiche Pellet, der sog. Buffy coat, abpipettiert und in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µl FluoroBeads-B (Superparamagnetische Beads gekoppelt an anti-CD19) wurden die Zellen 3 min bei RT inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die B-Lymphozyten wurde mit 1x Zitratpuffer gestoppt und die Röhrchen anschließend für 2 min an einen Magneten gestellt. Die B-Lymphozyten wurden im Magnetfeld festgehalten, während die übrigen Zellen in der Suspension abgesaugt wurden. Nach Zugabe von 5 ml 1x Zitratpuffer wurden die Zellen resuspendiert und die B-Zellen mittels zweimaliger Wiederholung von Inkubation im Magnetfeld und Absaugen der unmarkierten Zellen weiter angereichert.

Nach dem dritten Anreicherungszyklus wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und mit 25 µl Carboxy-Fluoreszeindiazetat (C-FDA) versetzt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das C-FDA penetriert in die Zytoplasmamembran und färbt sie grün. Nach der Inkubation wurde der Ansatz

mit 5 ml PBS versetzt, das Röhrchen abermals 2 min an den Magneten gestellt und die Suspension abgesaugt. Der Vorgang wurde einmal wiederholt und die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen. Schließlich wurde die Zellzahl im Mikroskop-Fotometer auf 1000 – 2000 Zellen pro μ l eingestellt [45].

Die Bestimmung des HLA-Typs erfolgte auf Mikrotestkammern, die in jeder Vertiefung einen oder mehrere definierte monoklonale Antikörper enthalten. Von der angereicherten und eingestellten B-Zellsuspension wurden jeweils 1 μ l in die Vertiefungen pipettiert und die Mikrotestkammern für 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach Bindung der Antikörper wurden in jede Vertiefung 5 μ l Kaninchenkomplement zugegeben. In Abhängigkeit einer Bindung der Antikörper wurde die Zellmembranintegrität vom Komplement zerstört oder nicht. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei RT im Dunkeln wurde die Reaktion mit der FluoroQuench AO/EB-Lösung gestoppt. Diese Lösung enthält die DNA-Farbstoffe Ethidiumbromid und Acridinorange, die nur die Kerne von Zellen färben, deren Membranintegrität zerstört ist (Analog der PI-Färbung) [23].

Die Auswertung erfolgte zuerst maschinell mit dem Mikroskop-Fotometer. Die Zellen wurden dabei mit einer Quecksilberdampf Lampe bestrahlt und fluoreszierten grün aufgrund des C-FDA in der Plasmamembran. Wenn in einer Vertiefung die Komplementlyse stattgefunden hatte, strahlten die Zellen zusätzlich ein rot-oranges Licht aus. Die Kammern wurden nacheinander auf das emittierte Licht gescannt, und es wurde ihnen vom Auswertecomputer ein Wert zwischen 1 (grün) und 8 (rot-orange) zugewiesen. Diese Werte wurden mit dem Auge nachgeprüft, und abschließend wurde der HLA-Typ festgelegt [216].

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Vollblutstimulation im Modellsystem und Anwendung

In diesem ersten Teil sollte eine Methodik entwickelt werden, die es ermöglichte antigenspezifische T-Zellen aufgrund ihrer Reaktivität gegen ein definiertes Antigen zu detektieren und zu charakterisieren. Weiterhin sollte diese Methodik funktionell, spezifisch, für den Routineeinsatz tauglich und ohne aufwendige Isolations- oder Präparationsschritte in einem überschaubaren Zeitrahmen durchführbar sein. Als Modellsystem wurde die Stimulation mit TT herangezogen, da nahezu jede Person mit diesem Vakzin geimpft wurde, und damit auf ein sehr großes Probandenkollektiv zugegriffen werden konnte.

Ausgehend von einem Kurzzeitstimulationsprotokoll für CMV-spezifische CTLs wurden alle wesentlichen Parameter auf ihre Notwendigkeit und ihren Einfluss auf die messbare Stimulation mit TT ausgetestet. Um die Detektion aktivierter T-Zellen zu verbessern wurde auch das Färbeprotokoll optimiert und verschiedene Inhibitoren auf ihre Eignung erprobt.

Weiterhin wurde die Möglichkeit einer breiteren Anwendung ausgelotet, indem der Stimulationsansatz mit lipophilen Antigenen ausgetestet wurde. Der Übergang auf Peptide des TT als Stimulus ermöglichte schließlich eine sehr spezifische Aktivierung der reaktiven T-Zellen.

Die Mechanismen der Antigenprozessierung, der Antigenerkennung, der T-Zellstimulation und die Beschreibung der einzelnen Aktivierungsantigene und Zytokine wurden in **1.2** ausführlich beschrieben.

3.1.1 Protokoll zur Kurzzeitstimulation

In dieser ersten Versuchsreihe wurde eine Wiederholung des von M. A. Suni et al. publizierten Kurzzeitstimulationsprotokoll mit dem Antigen TT durchgeführt. Die Austestung sollte die Frage klären, ob mit diesem Protokoll eine Stimulation messbar ist, wenn das verwendete Lysat des CMV durch das TT-Protein ersetzt wird [366].

Das Protokoll stellt eine Weiterentwicklung früherer Publikationen dar. Im Protokoll von S. L. Waldrop et al. stimulierte man ficollisierte antigenspezifische Th-Zellen mit einem Lysat des CMV und detektierte die Aktivierung mit dem DFZ [407]. Die Vorarbeiten dafür lieferten T. Jung et al. und L. J. Picker et al., die die Detektion der T-Zellaktivierung mittels DFZ über die intrazelluläre Färbung der exprimierten Zytokine etablierten [185; 303].

Methodik: Die Prozeduren für den Stimulationsansatz, die Detektion und die Identifizierung der aktivierten T-Zellen wurden in den Kapiteln **2.2.1**, **2.2.2** und **2.2.5** beschrieben.

Ergebnisse: In der nachfolgenden Tab. 3.1 wurden die Durchschnittswerte der antigenpositiven T-Lymphozyten und der beiden Subpopulationen dargestellt. Die zugehörigen Standardabweichungen bewegten sich alle im Bereich von 0,1 und wurden nicht aufgeführt.

	CD25	CD69	CD134	CD154	IFN-γ	IL-2
<i>CD3⁺ T-Zellen</i>						
PBS	0,22	0,22	0,23	0,22	0,20	0,19
TT	0,18	0,38	0,23	0,21	0,18	0,21
<i>CD8⁺ T-Zellen</i>						
PBS	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20	0,19
TT	0,17	0,32	0,20	0,11	0,23	0,21
<i>CD8⁻ T-Zellen</i>						
PBS	0,21	0,21	0,20	0,21	0,20	0,20
TT	0,15	0,36	0,20	0,24	0,19	0,19

Tab. 3.1: Prozentwerte antigenpositiver T-Zellen (n = 4)

Die Messungen der T-Lymphozyten ergaben nach der sechsstündigen Stimulation mit TT insgesamt keine erkennbare verstärkte Expression von Aktivierungsantigenen und Zytokinen. Lediglich CD69 zeigte als früher Stimulationsmarker

eine leichte Hochregulation bei $CD8^+$ und $CD8^-$ T-Zellen (ca. 0,4 % jeweils). Auch der durchschnittliche Anteil der $CD8^+$ (29,5 %) und der $CD8^-$ (69,0 %) an allen $CD3^+$ T-Lymphozyten blieb unabhängig von der Stimulation konstant.

Dieses Stimulationsprotokoll ist zur Detektion TT-spezifischer T-Lymphozyten nicht geeignet, weshalb in den weiteren Versuchen eine verbesserte Methodik erarbeitet wurde. Die Zielsetzung war, eine größere Anzahl dieser reaktiven T-Zellen in einem relativ kurzem Zeitraum stimulieren, detektieren und charakterisieren zu können.

3.1.2 Vergleich von drei Antikoagulanzen

Als Konsequenz aus den Ergebnissen der Kurzzeitstimulation sollte die Stimulationsdauer erheblich verlängert werden, um den Effekt des Antigens auf die eingesetzten Leukozyten zu verstärken.

Darüber hinaus sollte eine vergleichende TT-Stimulation von Vollblut, das in drei verschiedenen Monovetten abgenommen wurde, klären, ob das bisher verwendete Antikoagulanz Lithium-Heparin geeigneter war als die beiden anderen Gerinnungsinhibitoren EDTA oder Zitrat. Während Heparin an Antithrombin III bindet und damit die Blutgerinnung inhibiert, inaktivieren EDTA oder Zitrat verschiedene Gerinnungsfaktoren durch eine Depletion von Kalzium aus dem Blutplasma.

Methodik: Die Stimulation der verschiedenen Proben wurde entsprechend den Vorgaben verlängert (siehe **2.2.1**). Dagegen wurden die übrigen Protokolle der Detektion und Identifikation aus **2.2.2** und **2.2.5** nicht verändert.

Ergebnisse: In Tab. 3.2 wurden die Prozentwerte von $CD8^+$ (meist CTLs) und $CD8^-$ T-Lymphozyten (meist Th-Zellen) in den stimulierten und unstimulierten Ansätzen mit ihren Standardabweichungen (Stdabw) gegenübergestellt.

Population	Stimulus	Mittelwert	Stdabw
$CD3^+/CD8^+$	PBS	30,01	0,35
$CD3^+/CD8^+$	TT	29,63	0,86
$CD3^+/CD8^-$	PBS	66,81	0,48
$CD3^+/CD8^-$	TT	67,14	0,65

Tab. 3.2: Prozentwerte der beiden T-Zellsubpopulationen mit und ohne Antigen (n = 4)

Die Tabelle zeigt in den stimulierten Proben einen schwachen Anstieg (0,33 %) bei den CD8⁻ T-Zellen und einen schwachen Abfall (0,38 %) bei den CD8⁺ T-Zellen. Aufgrund der höheren Standardabweichungen bei den stimulierten Ansätze kann man jedoch nicht von einer eindeutigen Tendenz ausgehen.

Die Werte in Abb. 3.1 zeigen dagegen sehr deutliche Unterschiede. Sowohl die TT-Stimulationen in zitrathaltigen wie auch in EDTA-haltigen Blut hatten so gut wie keine Hochregulation der Aktivierungsantigene zur Folge. Einzig das Antikoagulum Lithium-Heparin ermöglichte eine Detektion aktivierter TT-spezifischer T-Lymphozyten nach 26 h Antigeninkubation. Außerdem zeigten sich hauptsächlich die CD8⁻ Th-Zellen als aktivierbar, während die Antworten der CD8⁺ CTLs meist eine gering höhere Expression der Aktivierungsmarker waren.

Der Vergleich der Aktivierungsmarker bei den Th-Zellen zeigt, dass CD25 und CD69 relativ hohe Werte lieferten (2 – 3 % der Th-Zellen), jedoch CD69 nicht bei allen Probanden hochreguliert wurde (erkennbar am hohen Fehlerbalken).

Die Antigene CD134 und CD152 ergaben Mittelwerte, die bei 0,5 – 1 % liegen und damit unter der definierten Grenze von 1 % für eine Stimulation sind. Das Antigen CD152 wurde auf den Th-Zellen aller Proben hochreguliert, während CD134 nur bei zwei Personen anstieg.

Die Werte aller anderen Antigene (CD71, CD154, IFN- γ und IL-2) lagen bei den Th-Zellen kaum über den eingestellten Kontrollwerten von jeweils 0,2 %; damit konnte in diesen Messungen keine Hochregulation bzw. Stimulation detektiert werden.

Bei den CD8⁺ CTLs konnte in keinem Ansatz von einer richtigen Hochregulation der Antigene gesprochen werden. Der relativ hohe Wert des Antigens CD69 im TT-stimulierten Blut mit Lithium-Heparin war ein Einzelwert. Dagegen ergab die CD25-Messung bei allen Proben leicht höhere Werte gegenüber den PBS-Kontrollen.

In den künftigen Experimenten wurden aufgrund dieser Ergebnisse nur noch Monovetten zur Blutentnahme verwendet, die Lithium-Heparin enthielten. Die Stimulation von ca. 26 h über Nacht mit TT wurde als ausreichend angesehen um antigenspezifische T-Lymphozyten im peripherem Blut zu detektieren. Weiterhin wurde in den folgenden Ergebnisdarstellungen auf die Angabe der CTL-Durchschnittswerte verzichtet, da bei dieser Subpopulationen nach der TT-Stimulation nur geringe Veränderungen festzustellen waren.

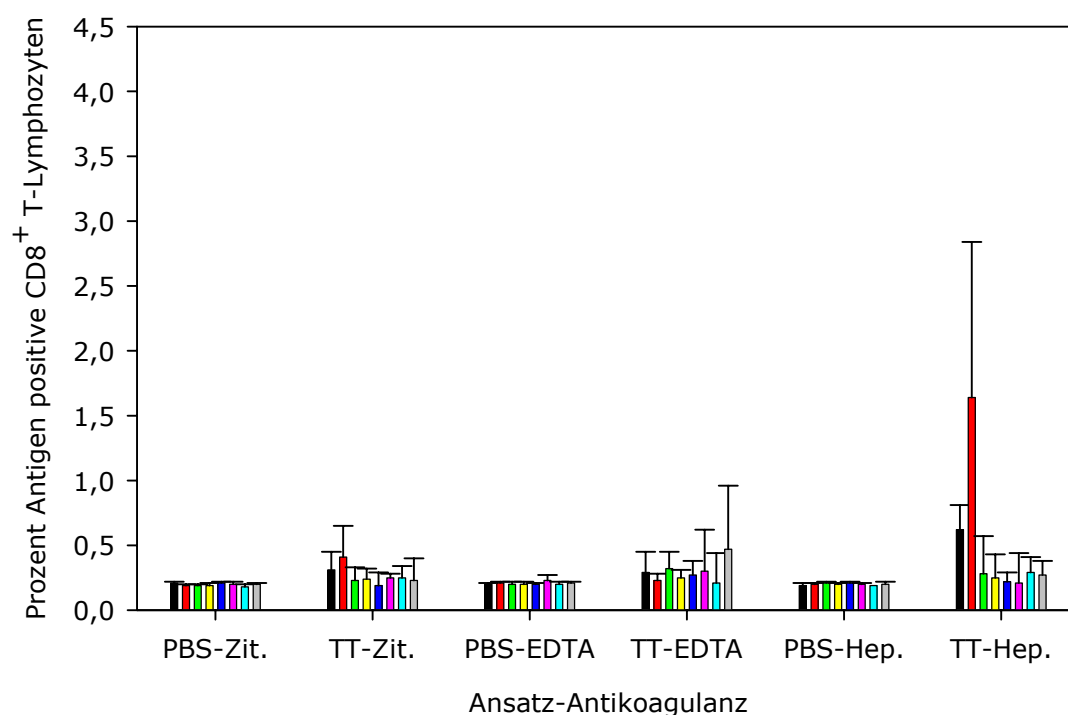
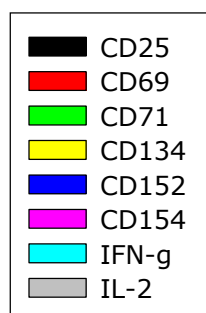
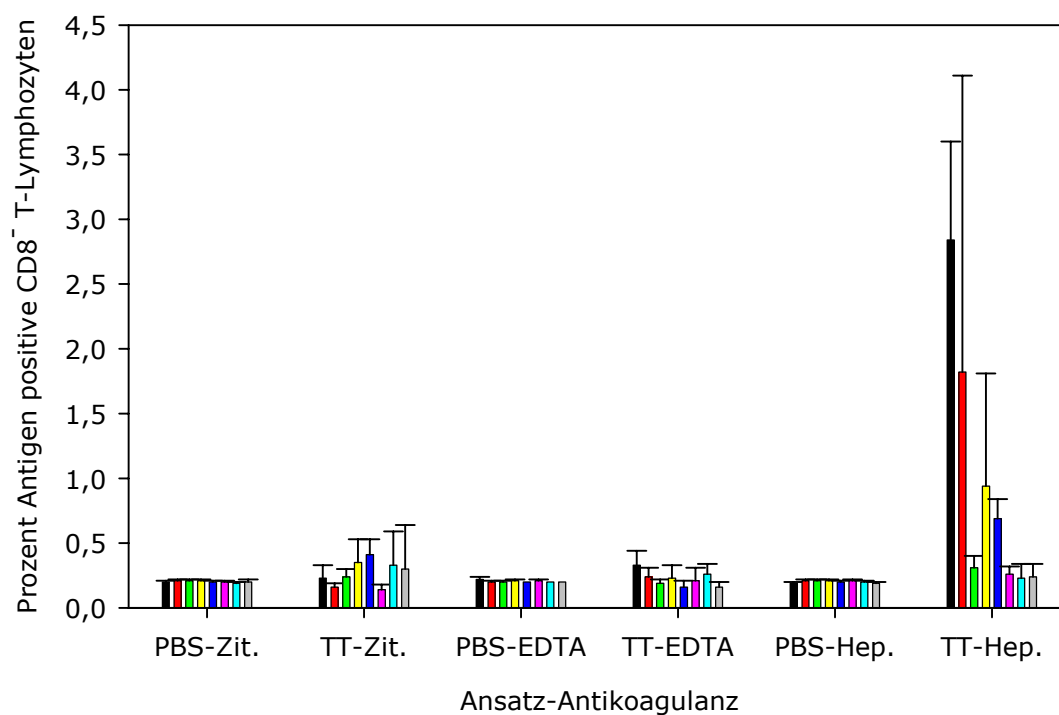


Abb. 3.1: Vergleich der Antigenexpression auf/in stimulierten T-Zellen in Anwesenheit verschiedener Antikoagulanzen (n = 4; Hep.: Heparin, Zit.: Zitrat)

3.1.3 Ermittlung der optimalen Zelldichte

Nach der erfolgreichen Stimulation von Vollblut mit TT im vorherigen Versuchsblock und der Bestimmung von Antikoagulanzen und Stimulationsdauer sollte jetzt die optimale Zelldichte definiert werden. Die Überlegung war, durch eine größere Verteilung der Leukozyten die Interaktionsbedingungen während der Stimulation zu verändern und den Einfluss auf die Anzahl aktivierter T-Lymphozyten zu ermitteln.

Methodik: Entsprechend den Ergebnissen der vorherigen Versuchen und der Fragestellung wurde das Stimulationsprotokoll in einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Da in allen verdünnten Ansätzen eine ausreichende Menge Blutserum vorhanden war, wurde auf eine zusätzliche Gabe von HS oder Kälberserum verzichtet (siehe **2.2.1**). Die Durchführung der Detektion und der Identifizierung reaktiver Th-Zellen nach **2.2.2** und **2.2.5** wurde nicht verändert.

Ergebnisse: Die Darstellung der Prozentwerte bei verschiedenen Verdünnungsstufen in Abb. 3.2 und 3.3 zeigt vor allem beim Antigen CD25 eine erkennbare Hochregulation. Von ca. 1,5 % CD25⁺ Th-Zellen im Ansatz mit 10 % Blutanteil stieg der Anteil auf ca. 3 % in den Ansätzen mit höheren Blutanteil.

Die Messung der Oberflächenmarker CD69, CD134 und CD152 ergab mit jeweils ca. 1 % der Th-Zellen die höchsten Werte in den unverdünnten Ansätzen. Diese waren allerdings teilweise mit erheblichen Standardabweichungen ausgestattet und wurden daher weniger gewichtet als die Messungen des Antigens CD25.

Weiterhin konnte bei den Aktivierungsantigenen CD71, CD154, IFN- γ und IL-2 von keiner Stimulation gesprochen werden. Die Hochregulation dieser Antigene war nur minimal und das weitgehend unabhängig vom Blutanteil des Ansatzes.

Die Verdünnungsstufe mit 33 % Blutanteil wurde schließlich als der beste Kompromiss erachtet und bei allen künftigen Stimulationsexperimenten eingestellt. Die Vorteile sind neben einer besseren Handhabung der Proben die Möglichkeit, die benötigte Menge an Vollblut reduzieren zu können.

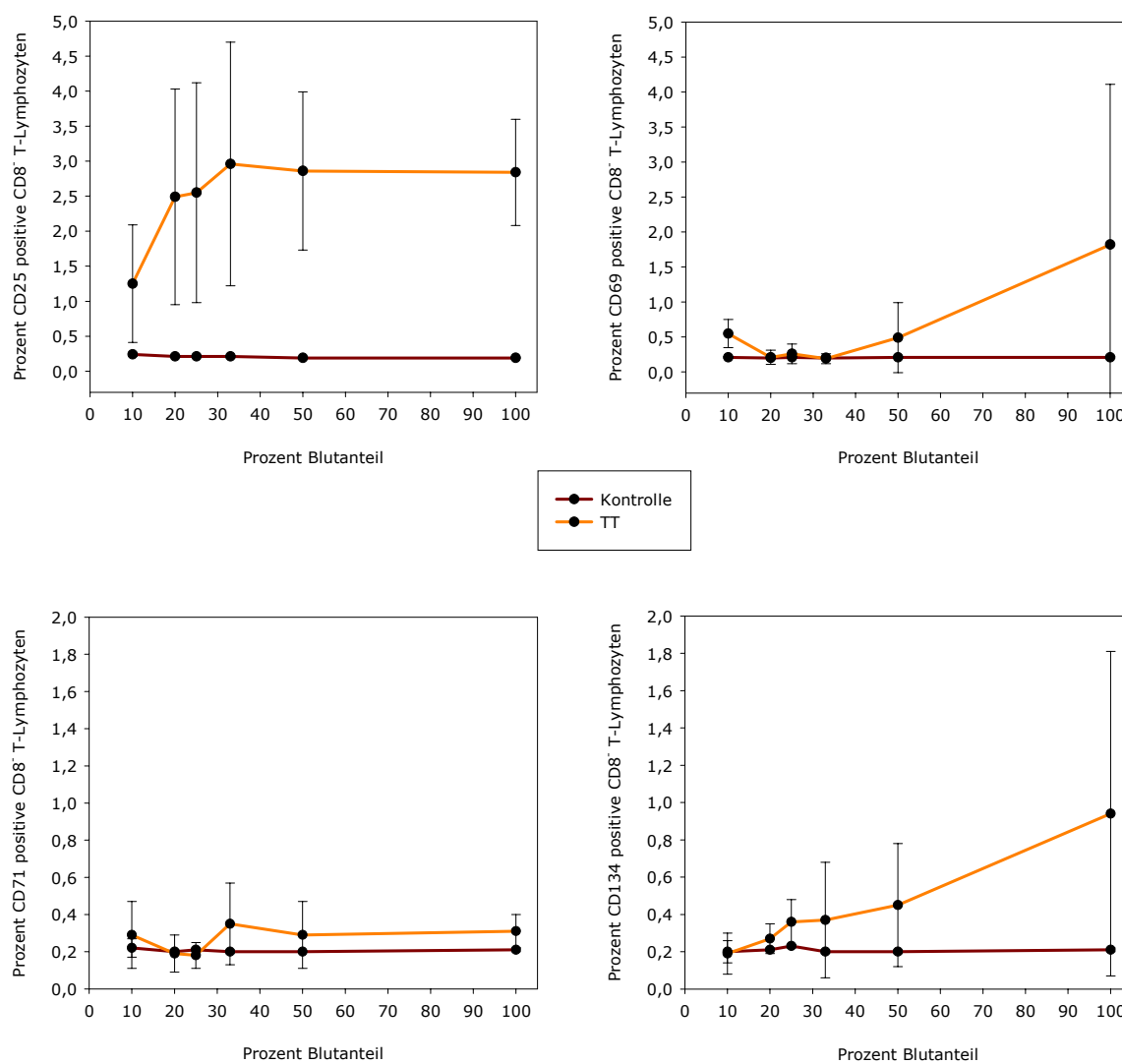


Abb. 3.2: Expression der Aktivierungsantigene CD25, CD69, CD71 und CD134 nach Stimulation in Abhängigkeit des Blutanteils (n = 4)

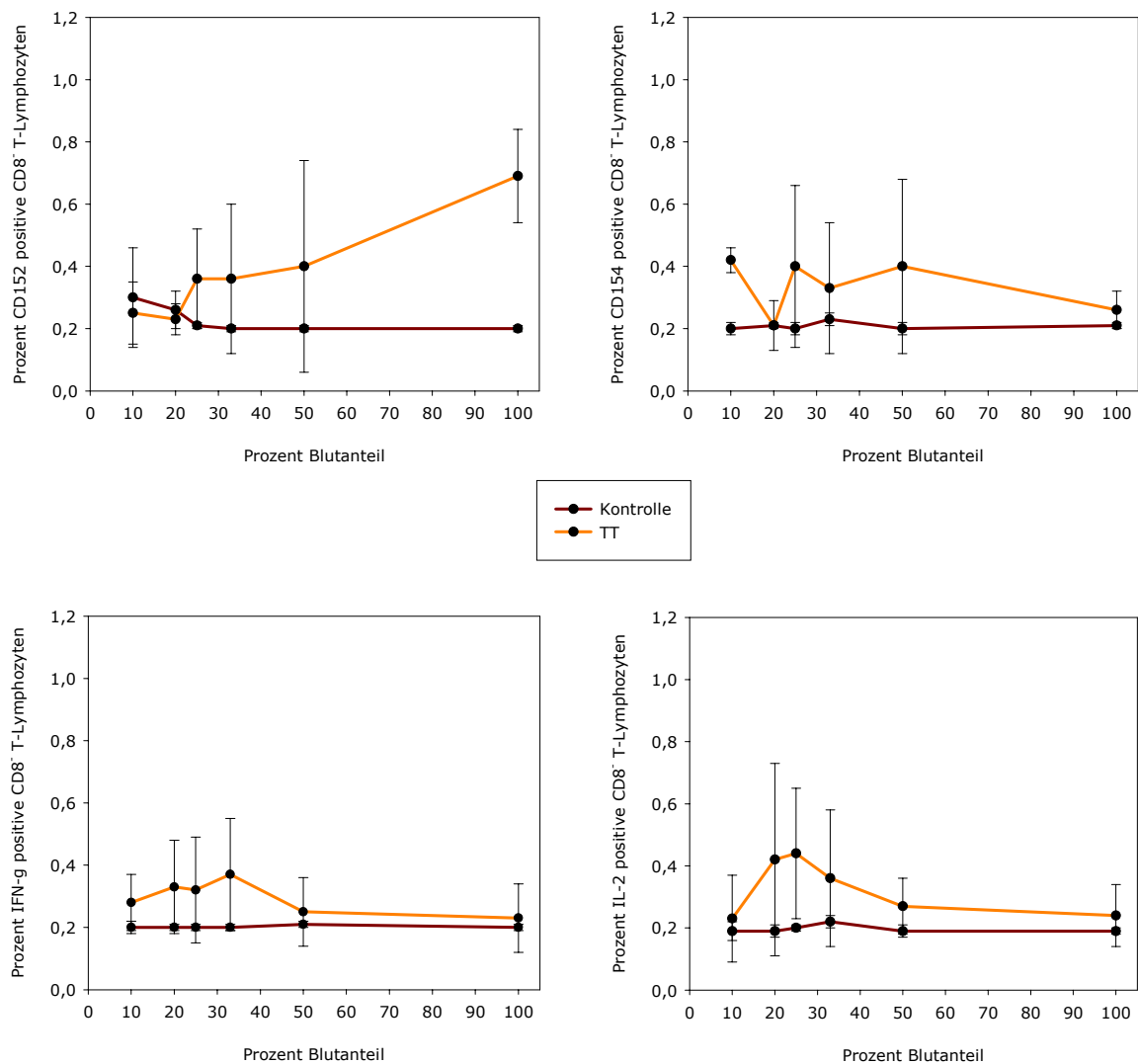


Abb. 3.3: Expression der Aktivierungsantigene CD152, CD154, IFN- γ und IL-2 nach Stimulation in Abhängigkeit des Blutanteils (n = 4)

3.1.4 Zellernte mit und ohne EDTA

Diese Versuchsreihe diente der Überprüfung eines Protokollschriffs vor der Ernte der inkubierten Ansätze. In diesem Schritt wurden die inkubierten Proben mit EDTA versetzt und auf Eis gestellt, um die aktivierten und eventuell adhärennten T-Zellen von der Oberfläche des Reaktionsnapfes abzulösen. Dies sollte helfen die Anzahl der detektierbaren stimulierten T-Zellen zu erhöhen. Da diese Inkubation Zeit und Aufwand erforderte, wurde eine Klärung seiner Notwendigkeit als sinnvoll erachtet.

Methodik: Das bisher modifizierte Stimulationsprotokoll wurde auf die EDTA-Inkubation überprüft (siehe **2.2.1**). Das Vorgehen bei der Detektion der T-Zellen wurde in **2.2.2** und die Auswertung der Messungen in **2.2.5** beschrieben.

Ergebnisse: Die Durchschnittswerte der antigenpositiven CD8⁺ Th-Zellen in Abb. 3.4 zeigen innerhalb der beiden Erntemethoden keine signifikanten Unterschiede.

Mit jeweils ca. 2 % an CD25⁺ Th-Zellen war bei dieser Subpopulation keine Veränderung festzustellen. Die Anzahl der detektierten Th-Zellen mit CD69-Expression stieg zwar mit der EDTA-Gabe von 2,4 auf 4,0 %, jedoch erhöhte sich auch die Standardabweichung. Ein ähnlicher Effekt konnte bei CD152 mit 0,4 und 0,9 % positiver Th-Zellen bei EDTA-Inkubation gesehen werden. Demgegenüber fiel der Mittelwert der CD154⁺ Th-Zellen von 1,5 auf 0,9 % in Anwesenheit von EDTA. Die intrazellulären Zytokine IFN- γ und IL-2 lieferten hingegen wieder nur eine kaum erhöhte Anzahl positiver Th-Zellen (ca. 0,3 %).

In den künftigen Optimierungsschritten wurde vor der Ernte der Blutproben auf die Zugabe von EDTA und der Inkubation auf Eis verzichtet, da aus dieser Messreihe keine wesentliche Verbesserung für die Detektion aktivierter Th-Lymphozyten hervorgeht. Außerdem wurde vorerst auf die Färbung und Messung der intrazellulären Zytokine verzichtet, da die bisher erhaltenen niedrigen Signale keine eindeutigen Aussagen ermöglichten.

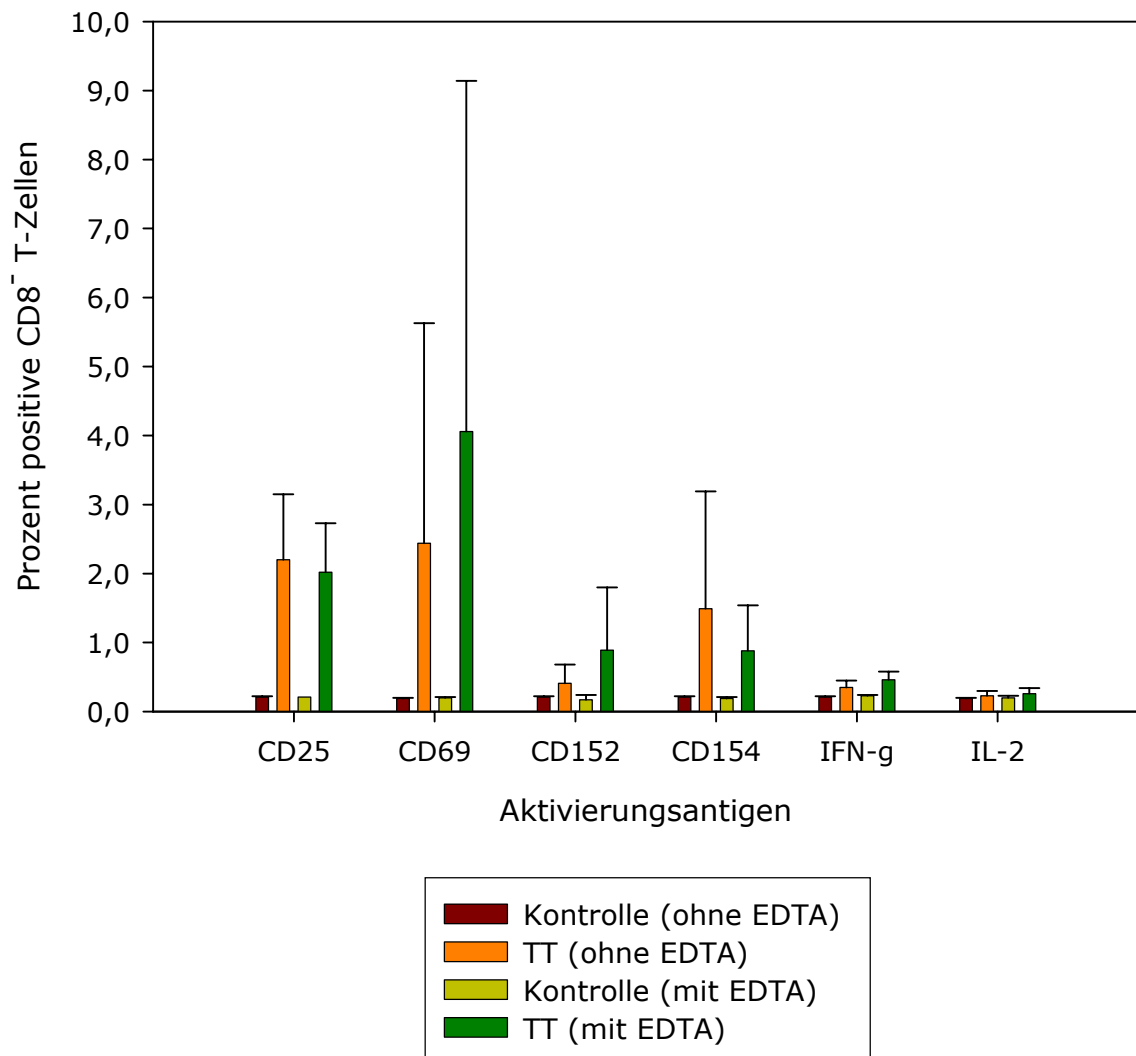


Abb. 3.4: Antigenpositive T-Zellen nach der Ernte mit und ohne EDTA (n = 4)

3.1.5 Ermittlung des optimalen Analysezeitpunkts

Die bisher durchgeführten Optimierungsschritte sollten durch eine Stimulationskinetik ergänzt werden, um zu klären wann eine Detektion aktivierter Th-Lymphozyten nach TT-Stimulation möglich war. Damit sollten auch die Lücken um die beiden bekannten Zeitpunkte 6 und 26 h geschlossen werden. Aus Gründen der Gleichbehandlung erschien es nicht sinnvoll eine Blockierung mit BFA durchzuführen, zumal auf die Detektion intrazellulärer Zytokine mangels Signal in den vorherigen Versuchen verzichtet wurde.

Methodik: Mit dem modifizierten Stimulationsprotokoll erfolgte eine Kinetik der TT-Inkubation (siehe **2.2.1**). Die Prozedur der Detektion und Analyse aktivierter T-Zellen aus **2.2.2** und **2.2.5** wurde beibehalten.

Ergebnisse: Der Vergleich der unterschiedlichen Inkubationszeiten in Abb. 3.5 demonstriert, dass auf den Th-Zellen alle vier gemessenen Aktivierungsmarker erst nach 22 h Stimulationsdauer hochreguliert wurden.

Dabei zeigten sich im Durchschnitt die meisten Th-Zellen positiv für CD69 (ca. 3 - 4 %), während die geringeren Prozentwerte der CD25⁺ und der CD134⁺ Th-Zellen mit 2 - 3 % etwa gleich waren. Das Antigen CD154 konnte selbst nach 28 h TT-Stimulation kaum besser detektiert werden als in der Kontrolle. Auffällig war, dass die Werte der CD25⁺ Th-Zellen wesentlich stabiler waren als die Werte der CD69⁺ und CD134⁺ Th-Zellen. Desweiteren konnten zwischen den Zeitpunkten 22 und 28 h nur geringe Unterschiede festgestellt werden.

Diese Kinetik demonstrierte, dass die Detektion der TT-Stimulation eine Inkubation über Nacht erfordert und damit der Versuch aus **3.1.1** mit 6 h Dauer nicht funktionieren konnte. Außerdem ergab sich bezüglich der Inkubationsdauer eine gewisse Flexibilität, da im Zeitraum von 22 bis 28 h nur kleine Differenzen gefunden wurden. In den weiteren Versuchen wurden die Ansätze wie bisher für mindestens 26 h mit TT stimuliert.

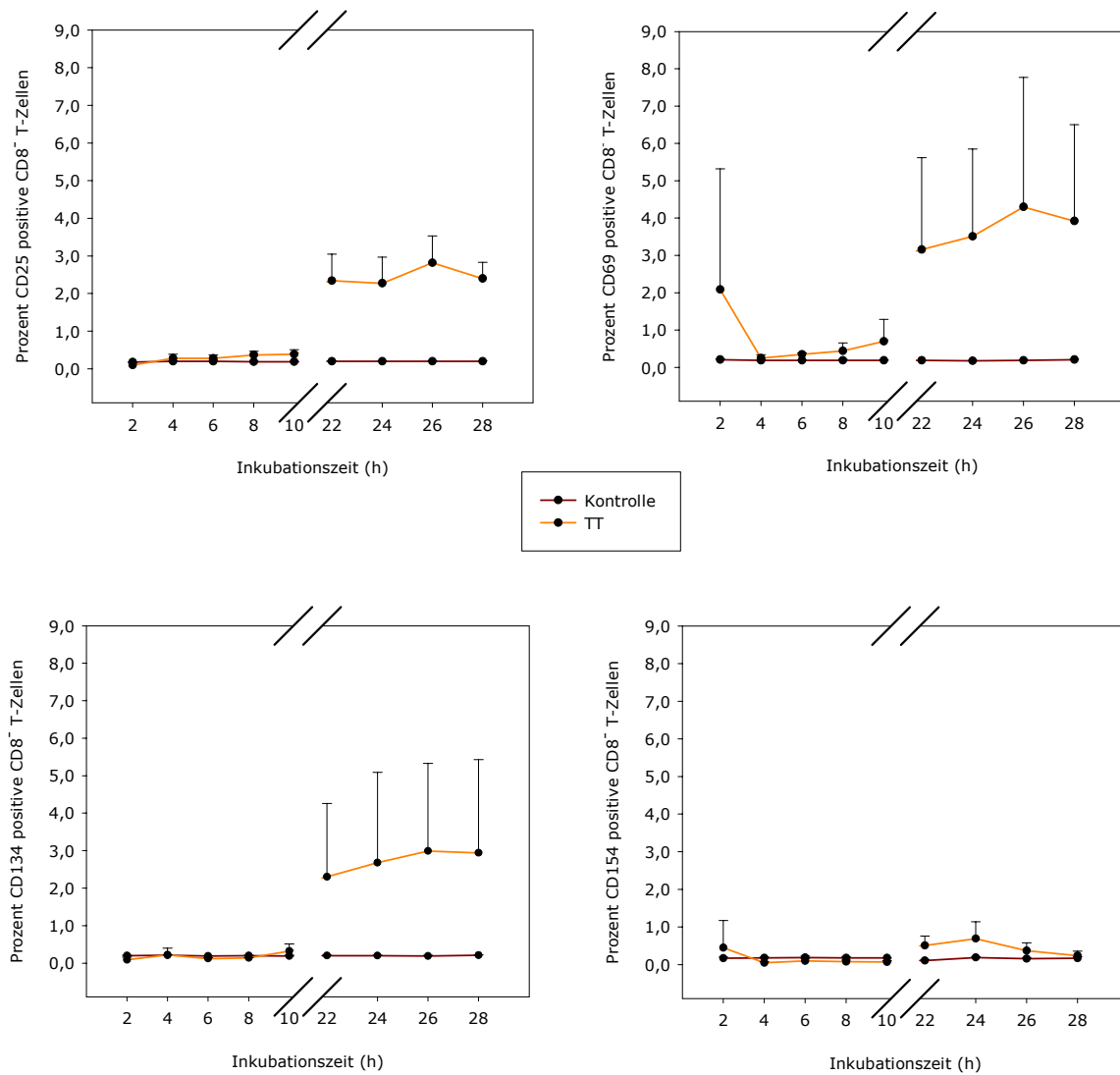


Abb. 3.5: TT-Stimulationskinetik von vier Aktivierungsantigenen (n = 4)

3.1.6 Optimierung der Detektion aktivierter T-Zellen

Nach der Austestung der verschiedenen Parameter des Stimulationsprotokolls sollten mit diesen Experimenten die optimale Färbemethode zur Messung der Oberflächenaktivierungsantigene gefunden werden. Das bisher verwendete Protokoll war sowohl für Oberflächenantigene als auch für intrazelluläre Zytokine gedacht. Da jedoch aufgrund ihrer niedrigen Werte auf die Detektion dieser Zytokine verzichtet wurde, sollten mehrere Möglichkeiten zur Färbung der Aktivierungsmarker in und auf der Zelle gegenübergestellt werden.

Außerdem sollte getestet werden, ob die bisherige Blockierung der Sekretion mit BFA bei den T-Zellen einen Einfluss auf das Signal der Aktivierungsantigene hatte. Denkbar wäre ein Anstieg des Signals infolge einer Blockierung der Proteasensekretion und der damit inhibierten Abspaltung der Aktivierungsmarker. Diese Abspaltung, das sog. shedding, ist zum Beispiel für CD25 beschrieben [187].

Methodik: Die nach dem modifizierten Stimulationsprotokoll inkubierten Ansätze (siehe **2.2.1**) wurden teilweise blockiert und auf drei verschiedene Vorgehensweisen gefärbt (siehe **2.2.2**). Die Analyse der Messungen erfolgte nach **2.2.5** unverändert.

Ergebnisse: Der Vergleich der einzelnen Inkubations- und Färbemethoden wurde an den vier gemessenen Oberflächenantigenen in Abb. 3.6 gegenübergestellt und ließ folgende Schlussfolgerungen zu:

Der Vergleich von unblockierten und blockierten Ansätzen innerhalb der einzelnen Antigene und Färbemethoden erbrachte meistens geringere Durchschnittswerte für die blockierten Ansätze (z. B. sank der Mittelwert von CD25⁺ Th-Zellen bei reiner Extrazellulärfärbung infolge Blockierung von 3,1 auf 2,3 %). Generell zeigten sich bei CD25 und CD152 keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Färbeprotokollen. Die Messung von CD69 ergab Werte, die darauf hindeuten, dass dieses Antigen gegenüber Fixierung und Blockierung empfindlich ist und dies das Signal verringerte. Aber auch bei diesen Messungen waren die Durchschnittswerte von hohen Standardabweichungen begleitet.

Die Färbung der Antigene nach Fixierung und Permeabilisierung in den Th-Zellen erbrachte vor allem bei CD154 eine deutliche Erhöhung: Während die Th-Zellen das Antigen nach 26 h Stimulation an der Oberfläche kaum erhöht exprimierten (0,5 – 0,8 %), zeigten sich nach Fixierung und Permeabilisierung deutlich mehr Th-Zellen positiv für dieses Aktivierungsantigen. Die geringe Expression auf der

Oberfläche erklärt auch den geringen Unterschied zwischen den Werten der simultanen und der sequenziellen Färbung dieses Antigens.

Als Konsequenz aus dieser Versuchsreihe wurden mit Blick auf CD154 in den weiteren Experimenten die Th-Zellen nach dem Protokoll der sequenziellen Färbung behandelt. Bei dieser werden die Aktivierungsantigene der Zellen ohne Blockierung zuerst extrazellulär und nach Fixierung/Permeabilisierung intrazellulär nachgefärbt.

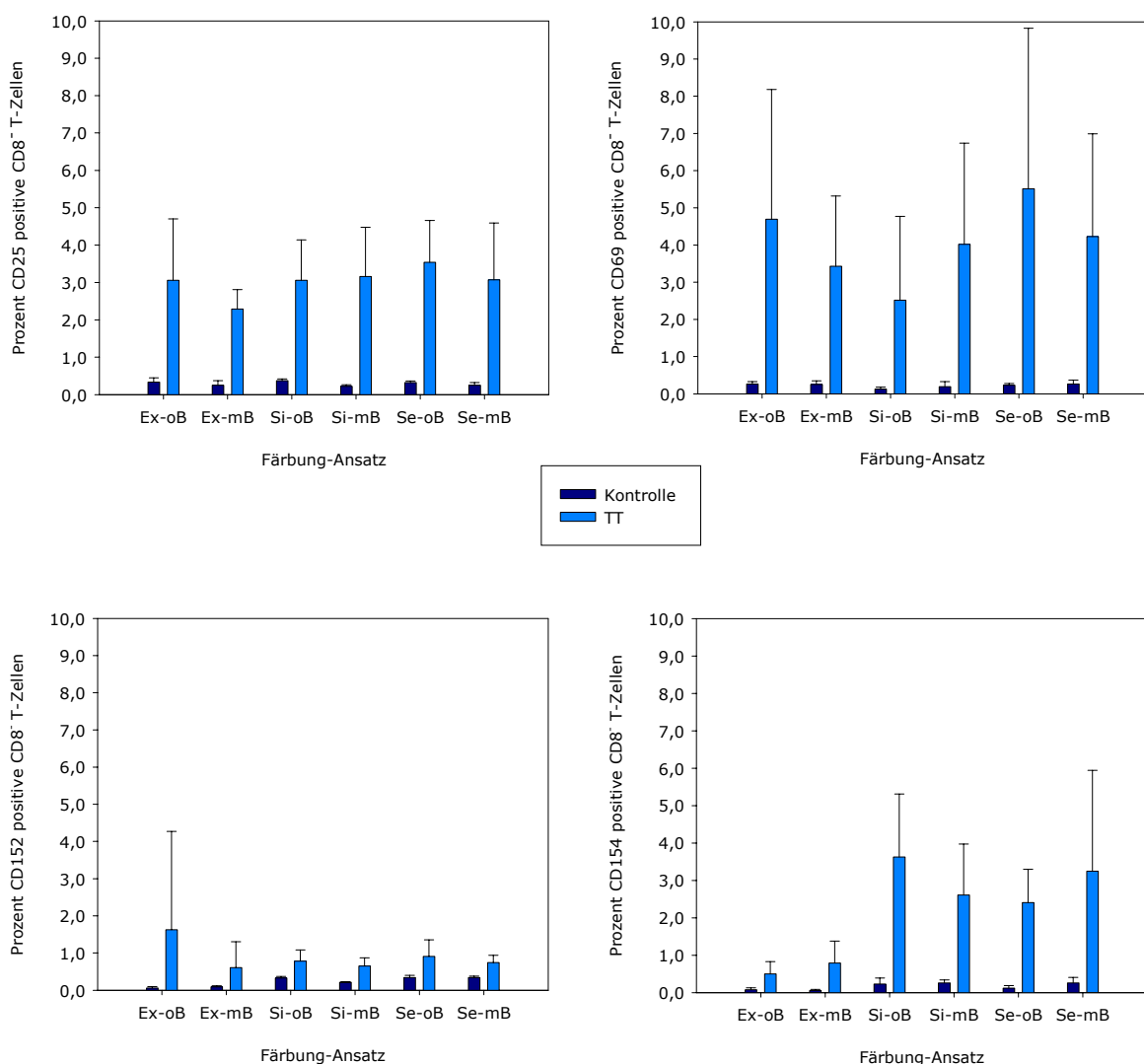


Abb. 3.6: Protokollvergleich der Färbung von vier Aktivierungsantigenen (n = 4; Ex: extrazellulär, Se: sequenziell, Si: simultan, mB: mit Blockierung, oB: ohne Blockierung)

3.1.7 Austestung verschiedener Proteaseinhibitoren

Das optimierte Stimulationsprotokoll der vorherigen Versuchsreihen sollte in den nachfolgenden Experimenten so modifiziert werden, dass die Anzahl der detektierbaren reaktiven T-Lymphozyten weiter erhöht werden konnte. Als eine Möglichkeit wurde die bereits erwähnte Blockierung von Proteasen in der Zytoplasmamembran gesehen und mit den beiden Inhibitoren Bestatin und Aprotinin erprobt.

Das Reagenz Bestatin wurde erfolgreich angewandt, um die Abspaltung von CD13 durch Metalloproteasen bei myeloiden Zellen zu verhindern [18]. Eine ähnliche Anwendung erfolgte mit Aprotinin: Die Gabe dieses Serinproteaseinhibitors verhinderte bei Neutrophilen die Abspaltung des Antigens CD62L [19]. Diesen beiden neuen Methoden wurde die bisherige Blockierung der Proteinsekretion über BFA und ein unblockierter Ansatz gegenübergestellt.

Methodik: Das Stimulationsprotokoll wurde entsprechend den Versuchszielen verändert (siehe **2.2.1**). Die Detektion und Identifizierung der reaktiven T-Zellen wurde entsprechend **2.2.2** und **2.2.5** durchgeführt.

Ergebnisse: Die Abb. 3.7 lässt bei den einzelnen Aktivierungsmarker unterschiedliche Wirkungen der Reagenzien erkennen.

Die Messung des Oberflächenantigens CD25 ergab in allen stimulierten Ansätzen eine relativ konstante Anzahl von ca. 4 % positiver Th-Zellen unabhängig von der Inhibition. Lediglich die hohe Bestatinkonzentration ließ diesen Wert etwas sinken.

Für das Antigen CD152 wurden mit weniger als 1 % der Th-Zellen zuwenig positive Ereignisse erfasst, weshalb eine Beurteilung hier nicht möglich war.

Das Signal des Oberflächenantigens CD69 wurde von durchschnittlich 4 % positiver Th-Zellen im unblockierten TT-Ansatz auf 2 – 3 % bei allen blockierten Proben reduziert. Somit ergab sich für das Signal dieses Antigens keine positive Wirkung durch die Blockierung.

Einzig die Messung von CD154 zeigte eine Erhöhung bei den aktivierten positiven Th-Zellen von 1,5 % ohne Blockierung auf 2 – 2,5 % in den Ansätzen mit Aprotinin. Die Inkubation mit Bestatin bewirkte keinen so deutlichen Anstieg der Mittelwerte.

Diese Erhöhung des messbaren Anteils an CD154⁺ Th-Zellen wurde zum Anlass genommen, den Inhibitor Aprotinin weitergehend zu untersuchen. Die beiden

anderen Blockierungen mit BFA oder Bestatin wurden als negativ bewertet und fallen gelassen.

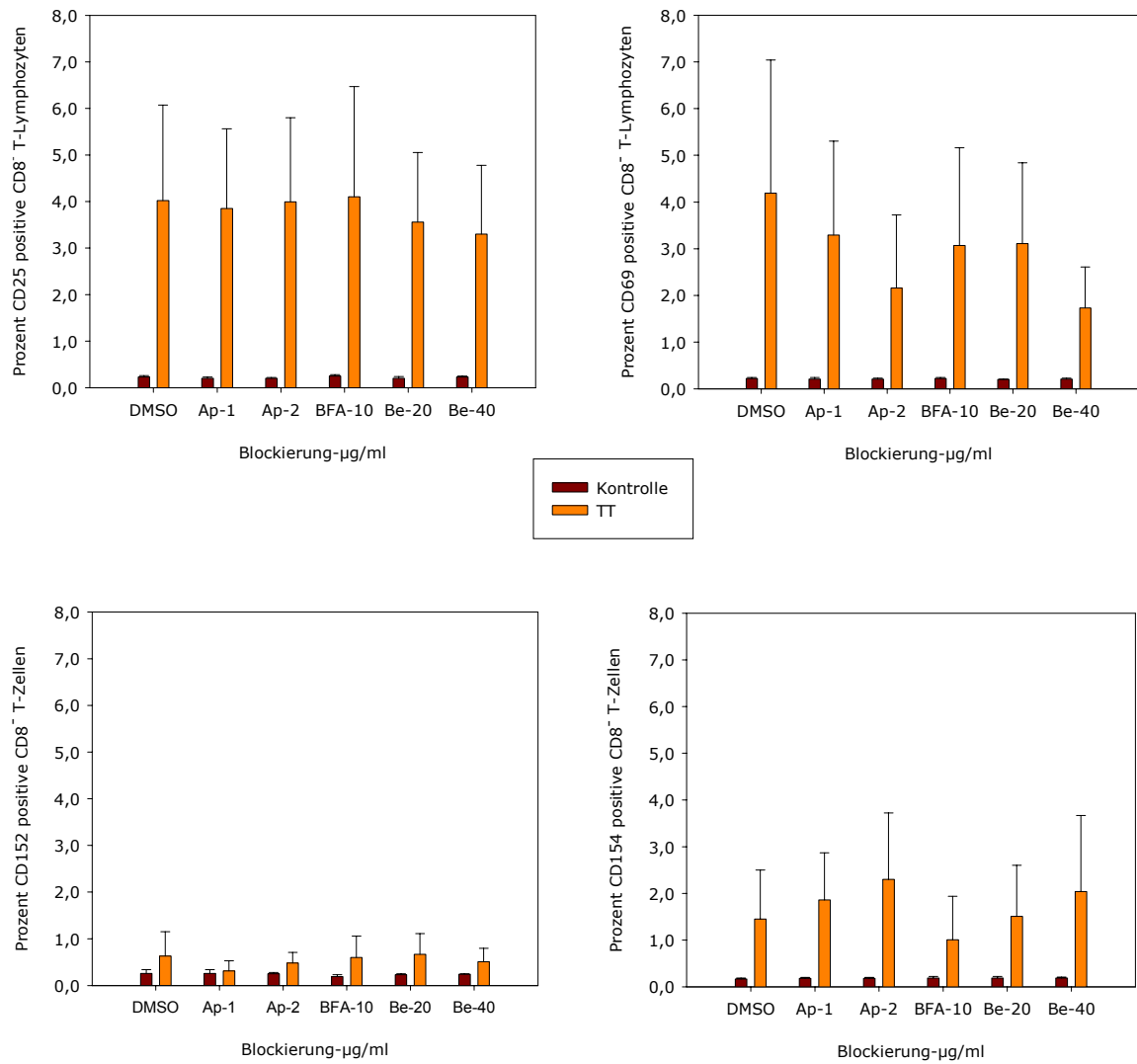


Abb. 3.7: Detektion aktivierter Th-Zellen nach Stimulation und Zugabe inhibierender Reagenzien (n = 4; Ap: Aprotinin, Be: Bestatin, BFA: Brefeldin A, DMSO: Lösungsmittelkontrolle)

3.1.8 Optimierung der Aprotininkonzentration

Nachdem sich der Serinproteaseinhibitor Aprotinin in der vorherigen Versuchsreihe als eine Möglichkeit zur Steigerung der Detektion aktivierter T-Zellen gezeigt hatte, sollte in diesen Experimenten eine Bestimmung seiner optimalen Konzentration erfolgen. Der Vergleich mit unblockierten Ansätzen sollte wie im vorhergehenden Versuchsteil den positiven Effekt erkennbar machen.

Methodik: Das Stimulationsprotokoll wurde in Anwesenheit einer steigenden Konzentration von Aprotinin nach **2.2.1** durchgeführt. An der Färbung und Analyse der reaktiven T-Zellen wurde nichts geändert (siehe **2.2.2** und **2.2.5**).

Ergebnisse: In Abb. 3.8 sind die Durchschnittswerte der vier gemessenen Aktivierungsantigene nach TT-Stimulation in Abhängigkeit der Aprotininkonzentration dargestellt.

Die Anzahl der CD25⁺ Th-Zellen stieg infolge der Gabe von 2 µg/ml Aprotinin von ca. 2 auf 3 %, um bei höheren Konzentrationen wieder auf den Ausgangswert zu sinken.

Für das Signal des Antigens CD69 auf den Th-Zellen war die Inkubation mit Aprotinin bei hohen Konzentrationen mit einem Rückgang des Durchschnittswertes von 3 auf 1 % verbunden. Bereits 4 µg/ml Aprotinin führten zu weniger CD69⁺ Th-Zellen wie in den unblockierten Proben.

Die verschiedenen Konzentrationen bewirkten bei den CD134⁺ Th-Zellen uneinheitliche Effekte. Der Wert von knapp 3 % pendelte bei den kleineren Aprotininkonzentrationen. Bei höheren Gaben gingen die Mittelwerte der stimulierten Th-Zellen bis auf 1,5 % zurück.

Den deutlichsten positiven Effekt konnte man wie im vorhergehenden Versuchsblock bei den CD154⁺ Th-Zellen messen. Die Koinkubation mit 2 und 4 µg/ml Aprotinin ergab ca. 2 % und mehr positive Th-Zellen anstatt unter 1 % für unblockierte Ansätze. Höhere Aprotininkonzentrationen führten auch bei diesem Antigen zu einem Absinken der Mittelwerte.

Für die folgende Versuchsreihe wurde mit einer Konzentration von 2 µg/ml Aprotinin weitergearbeitet. Diese Menge erschien als der beste Kompromiss bezogen auf die unterschiedlichen Auswirkungen für die einzelnen Aktivierungsantigene.

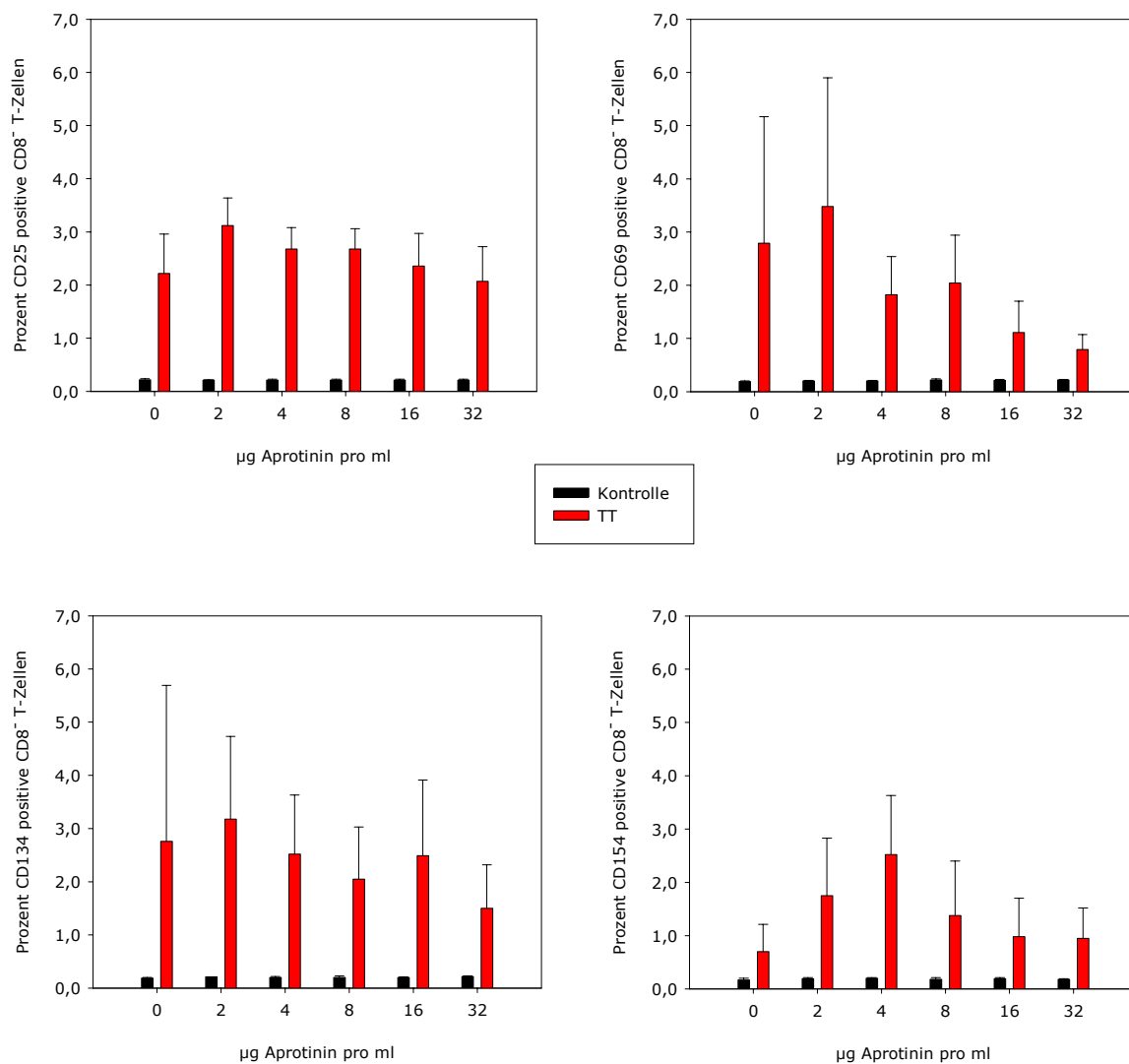


Abb. 3.8: Detektion der Aktivierungsmarker bei stimulierten Th-Zellen in Abhängigkeit der Aprotininkonzentration (n = 4)

3.1.9 Vergleich der Aprotininwirkung im Zeitverlauf

Die Optimierung des Aprotinineinsatzes sollte nach der Ermittlung der optimalen Konzentration mit dieser Versuchsreihe abgeschlossen werden, in der die beste Vorinkubationsdauer erprobt werden sollte. Die Annahme war, dass der kritische Zeitpunkt für die Zugabe des Aprotinins im ersten Drittel des Gesamtinkubationszeitraums lag. Eine spätere Zugabe wurde als nicht sinnvoll erachtet, da dann der kumulative Effekt auf die Aktivierungsmarker zu schwach wäre.

Methodik: Das Stimulationsprotokoll und die Blockierungen erfolgten gemäß **2.2.1**. Die Vorgehensweisen bei Färbung und Analyse der Messungen wurden nicht verändert (siehe **2.2.2** und **2.2.5**).

Ergebnisse: Wie Abb. 3.9 erkennen lässt, hatte die Addition von Aprotinin unabhängig von der Vorinkubationszeit keinen erkennbaren positiven Effekt für alle vier gemessenen Aktivierungsantigene.

Während der Durchschnittswert von CD25 wiederum relativ konstant blieb (ca. 2,5 % der Th-Zellen), zeigten die Antigene CD69 und CD134 sehr instabile Mittelwerte mit hohen Standardabweichungen (jeweils ca. 3,5 % +/- 4,5 der Th-Zellen). Der Oberflächenmarker CD154 ließ nur eine schwache Stimulation mit ca. 1 % positiven Th-Zellen erkennen. Eine Beurteilung des Aprotinineffekts war hier nicht möglich.

Im Verlauf weiterer erfolgter Experimente (Daten nicht gezeigt) wurde die Wirkung von Aprotinin nicht wieder bestätigt. Die Ursache dafür blieb vollkommen unklar.

Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen auf die Zugabe des Proteasehemmers Aprotinin und auch anderer blockierender Reagenzien verzichtet. Die erhaltenen Prozentwerte wurden auch ohne deren Wirkung als ausreichend angesehen, um eine erfolgte Stimulation erkennen zu können. Darüber hinaus stellte der Verzicht auf weitere Reagenzien sicher, dass der gemessene Effekt einzig durch die Antigenzugabe bewirkt wurde (von möglichen kostimulierenden Verunreinigungen abgesehen).

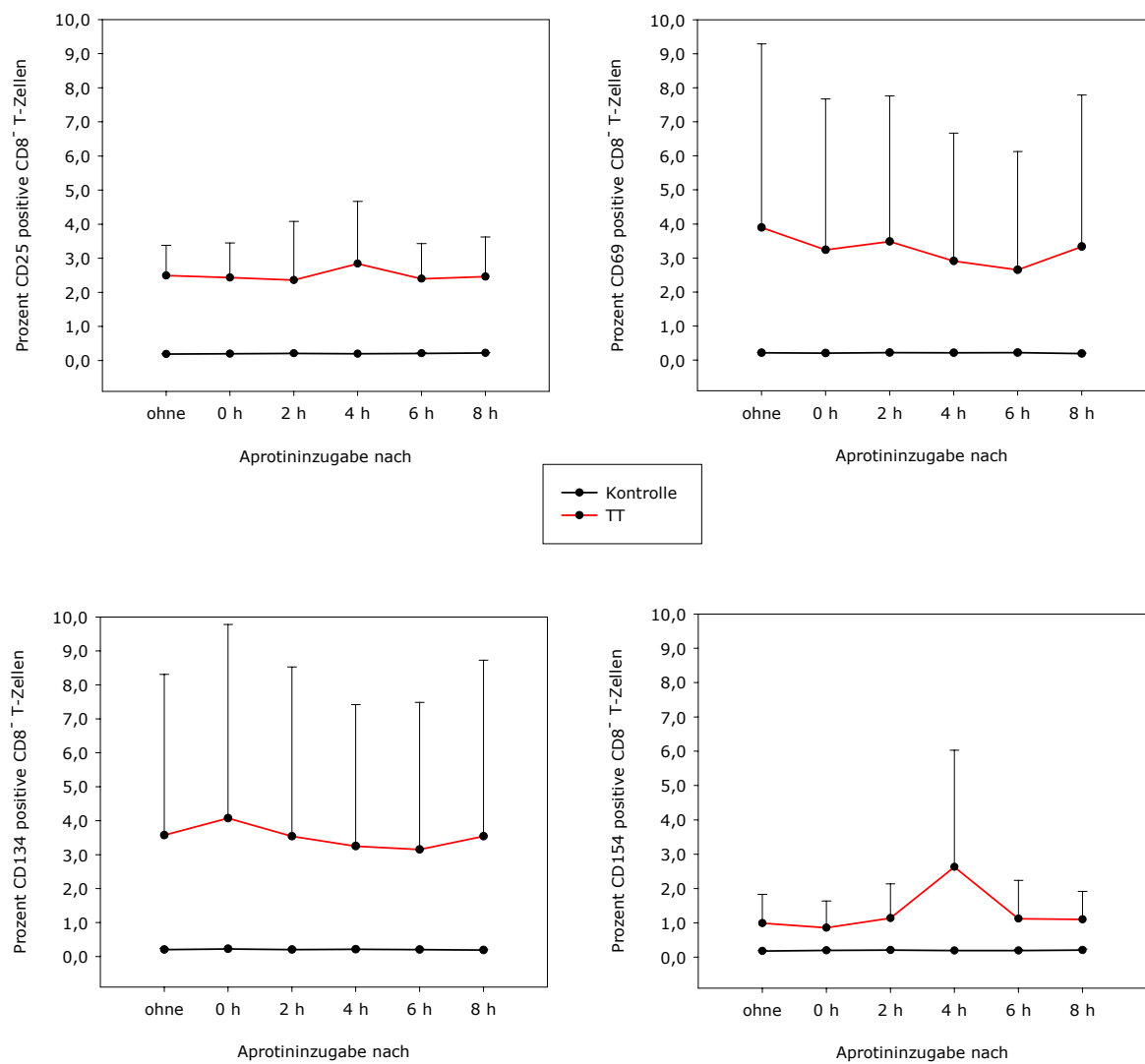


Abb. 3.9: Expression der Oberflächenantigene in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Aprotininzugabe (n = 4)

3.1.10 Stimulation von Vollblut mit lipophilen Substanzen

Der optimierte Vollblutstimulationsassay sollte in dieser Versuchsreihe auf seine Eignung für lipophile Substanzen als Stimuli erprobt werden. Dazu wurde das bisher verwendete Antigen TT durch ein rekonstituiertes Lyophilisat des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* ersetzt. Die Grundlage hierfür waren zwei Veröffentlichungen von J. Gong et al. und A. Shamshiev et al., in denen lipidantigenspezifische T-Zellen charakterisiert bzw. lipidreaktive T-Zellklone gewonnen wurden [123; 346]. Die Bedeutung der CD1-Moleküle für diese Immunantworten wurde in **1.2.2.2.4** dargestellt. Für die Stimulation wurde angenommen, dass sich in PBS weitgehend hydrophile Antigene und in Ethanol (EtOH) meist lipophile Antigene lösen würden. Dem Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eine Mittelstellung, mit einer Löslichkeit für beide Antigengruppen, zugedacht. Im Gegensatz zur TT-Stimulation handelte es sich in allen drei Fällen um eine Mischung aus vielen verschiedenen Antigenen, weshalb man hier von einer gemischten Stimulation ausgehen musste.

Methodik: Das veränderte Stimulationsprotokoll wurde in **2.2.1** beschrieben. Die Durchführung von Detektion und Identifizierung reaktiver T-Zellen erfolgte wie in **2.2.2** und **2.2.5**.

Ergebnisse: Die Abb. 3.10 und 3.11 zeigen für die drei verschieden gelösten Stimuli eine deutliche Reaktion nur bei den Ansätzen, die mit den in PBS rekonstituierten Antigenen stimuliert wurden.

Eine Hochregulation des Antigens CD25 konnte hauptsächlich auf den Th-Zellen in den Ansätzen mit PBS- und DMSO-gelösten Antigenen gemessen werden. Die Inkubationsdauer von vier statt einem Tag führte im PBS-Ansatz zum Anstieg der positiven Th-Zellen von 0,7 auf 2,5 %. Der DMSO-Ansatz ergab ebenfalls nach vier Tagen einen höheren Durchschnittswert mit 1,3 gegenüber 0,7 % CD25⁺ Th-Zellen. Die in EtOH gelösten lipophilen Antigene bewirkten nur eine schwache Stimulation mit 0,5 % aktivierter Th-Zellen. Auf den CTLs konnte meistens keine Hochregulation von CD25 gemessen werden.

Dagegen wurden die drei anderen Aktivierungsantigene CD69, CD134 und CD154 selbst nach vier Tagen Stimulation auf höchstens 0,5 % der Th-Zellen oder der CTLs detektiert.

Von einer erfolgreichen Aktivierung der T-Zellen konnte trotz der Vielzahl potenzieller Antigene nicht gesprochen werden. Die rein lipophilen Stimulationen mit den in EtOH gelösten Antigenen erbrachten nur sehr geringe Werte an

antigenpositiven Th-Zellen. Die Sensitivität des Stimulationsprotokolls ist für lipophile Antigene unter den gegebenen Bedingungen zu gering.

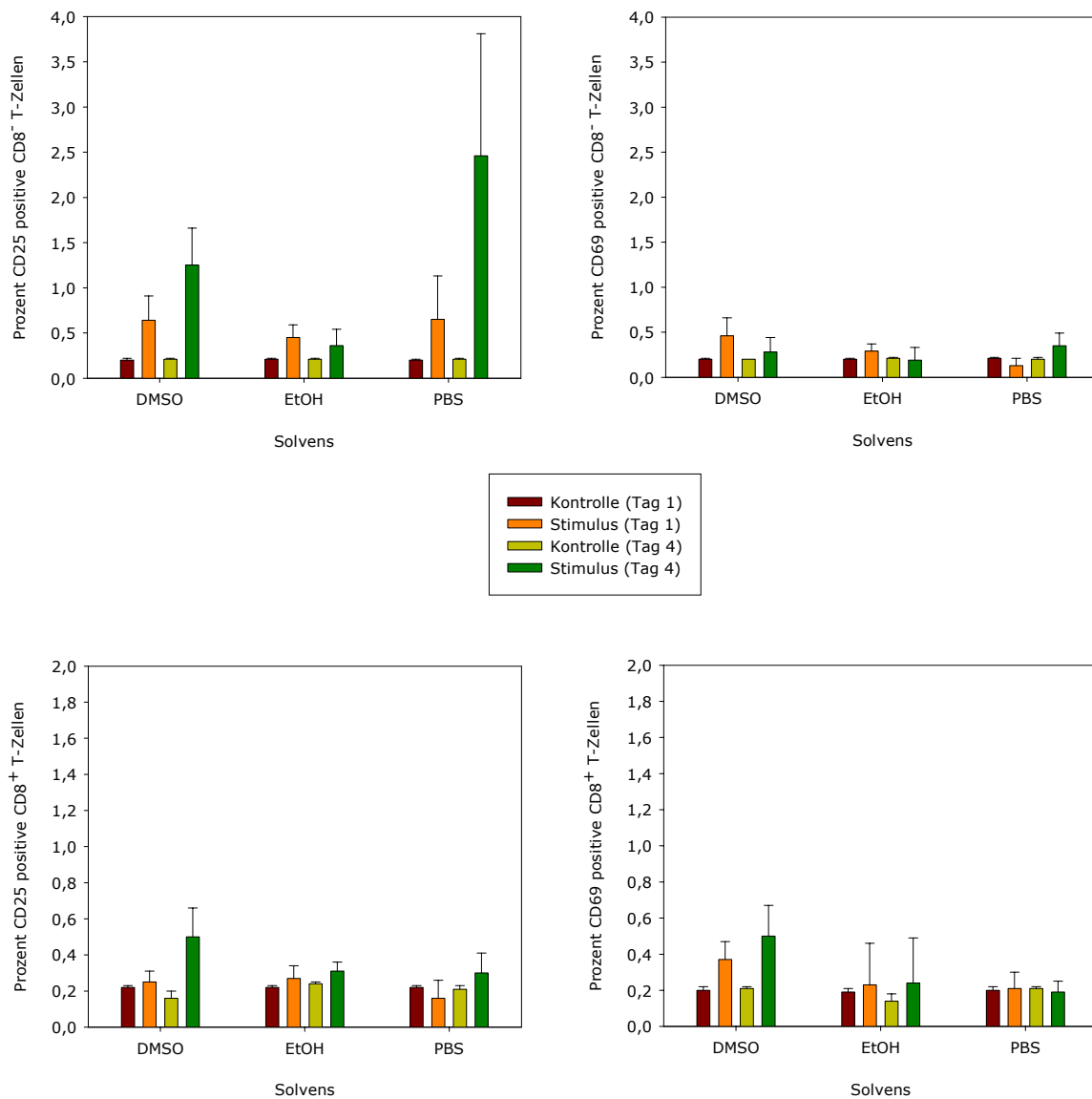
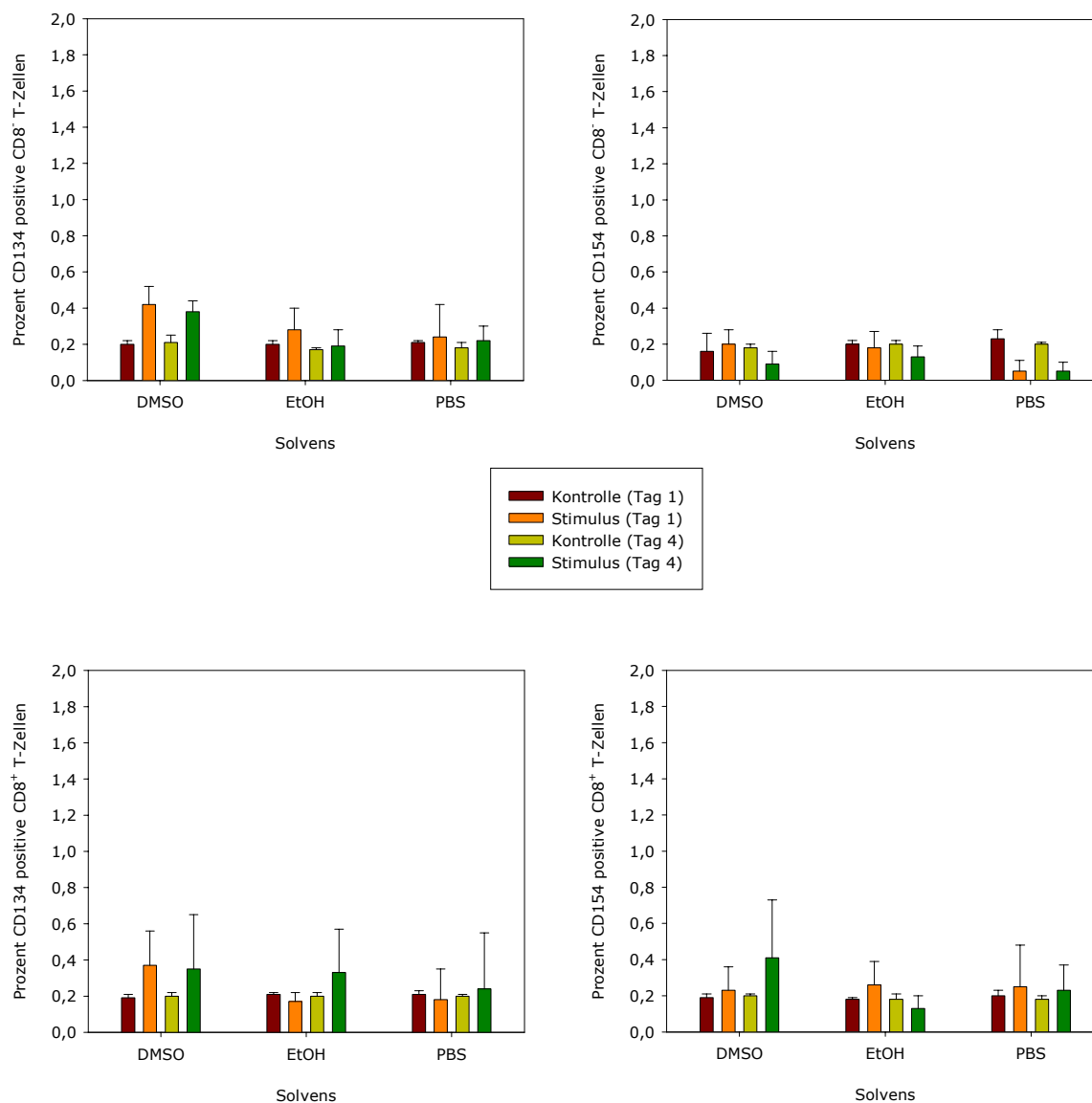


Abb. 3.10: Expression von CD25 und CD69 auf CD8⁺ T-Lymphozyten

Abb. 3.11: Expression von CD134 und CD154 auf CD8⁺ T-Lymphozyten

3.1.11 Erprobung stimulierender TT-Peptide

In einer weiteren Anwendung des Stimulationsprotokolls sollten die Proben mit einzelnen Peptiden des TT inkubiert werden. Die Möglichkeit Th-Zellen mit TT-Peptiden zu stimulieren wurde bereits von B. M. Diethelm-Okita et al. gezeigt. Allerdings wurden hier isolierte CD4⁺ Leukozyten mehrere Tage mit den TT-Peptiden inkubiert und ihre Proliferation infolge der Stimulation über den Einbau von radioaktiven Thymidin nachgewiesen [81; 82]. Die Sequenz des Tetanustoxin-Gens und die Aminosäuresequenz sind bereits länger bekannt. Das Toxin hat 1315 Aminosäuren (ca. 150 kDa) mit einer leichten Kette aus 458 Aminosäuren und einer schweren Kette aus 857 Aminosäuren [90]. Die Sequenzen der verwendeten vier 20er Peptide (TTP1 bis TTP4) sind im Kontext der gesamten Aminosäuresequenz von Tetanustoxin in **7** angegeben. Das ungefährliche TT wird aus dem Toxin über eine partielle Denaturierung der Raumstruktur hergestellt, weshalb die Abfolgen der Aminosäuren identisch sind.

In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob es möglich ist, mit dem optimierten Vollblutassay die Stimulation der TT-Peptide nach einem Tag mit dem DFZ detektieren zu können. Mit diesem neuen Ansatz sollte zum einen die Phagozytose und die intrazelluläre Prozessierung des TT in den DCs übergangen werden und der MHC-II direkt beladen werden. Zum anderen sollte gezeigt werden, dass bereits wenige definierte Epitope ausreichend sind, um im relativ kurzen Zeitraum die Aktivierung der T-Zellen bewirken zu können und dies mittels Hochregulation der Antigene detektieren zu können.

Methodik: Das Stimulationsprotokoll wurde mit dem TT-Protein und/oder den Peptiden nach **2.2.1** durchgeführt. Die Detektion und die Auswertung der Messungen wurden in **2.2.2** und **2.2.5** beschrieben.

Ergebnisse: Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe in Abb. 3.12 zeigen bereits nach nur 26 h eine Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker auf den Th-Zellen der verschiedenen Ansätze. Die Auswertung der CTLs erbrachte meist nur Mittelwerte im Bereich der Lösungsmittelkontrollen (Daten nicht gezeigt) und damit keine erkennbare Stimulation.

Die Werte der CD25⁺ Th-Zellen waren im TT-Ansatz im Durchschnitt am höchsten (2,4 %), während die Inkubation mit den einzelnen Peptiden oder allen zusammen (TTPX) nur eine geringe Hochregulation des IL-2-Rezeptors bewirkten (0,3 – 0,7 %). Interessanterweise führte die Kombination von TTP1 bis TTP4 mit

TT (TT+PX) zu einem niedrigeren Anteil an CD25⁺ Th-Zellen (1,5 %) als der TT-Einzelansatz.

Eine abweichende Zusammensetzung der Ergebnisse konnte bei den CD69⁺ Th-Zellen gefunden werden. Hier waren die Durchschnittswerte für TT und TT+PX am höchsten (ca. 3,5 %) und fast identisch. Das TTP3 führte alleine zu 1,5 % positiver Th-Zellen im Vergleich zu 1,8 % im Ansatz TTPX mit allen vier Peptiden. Die übrigen Peptide stimulierten die Th-Zellen nur wenig.

Eine deutliche Differenz zu den beiden vorherigen Aktivierungsmarkern konnte bei den Prozentwerten der CD134⁺ Th-Zellen gefunden werden. Hier führte die Inkubation mit den Peptiden kaum zu einer Hochregulation (ca. 0,3 %); nur das Gesamtprotein TT ergab eine erkennbare positive Th-Subpopulation von 3,2 % Anteil. Die Inkubation mit allen Stimuli in TT+PX ergab so niedrige Mittelwerte, dass man fast von einer Inhibition der CD134-Expression sprechen konnte. Die Ursache dafür ist unklar.

Für die Expression von CD154 auf den Th-Zellen konnte ein zu CD134 fast identisches Bild gefunden werden. Zwar konnten im TT-Ansatz nur ca. 1 % CD154⁺ Th-Zellen gemessen werden, jedoch war auch bei diesem Antigen keine Hochregulation im TT+PX-Ansatz zu detektieren. Die Werte der einzelnen Peptidansätze waren kaum höher als die Lösungsmittelkontrolle.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass es möglich ist mit den TT-Peptiden Th-Zellen über Nacht zu stimulieren und dies mit den Aktivierungsmarkern CD25 oder CD69 zu detektieren. Eine erfolgreiche Stimulation von TT-spezifischen Th-Zellen ist daher nicht von einer vorherigen Prozessierung des Antigens abhängig. In der folgenden Versuchsreihe sollte mit TTP1 die optimale Peptidkonzentration für diese Stimulation erprobt werden.

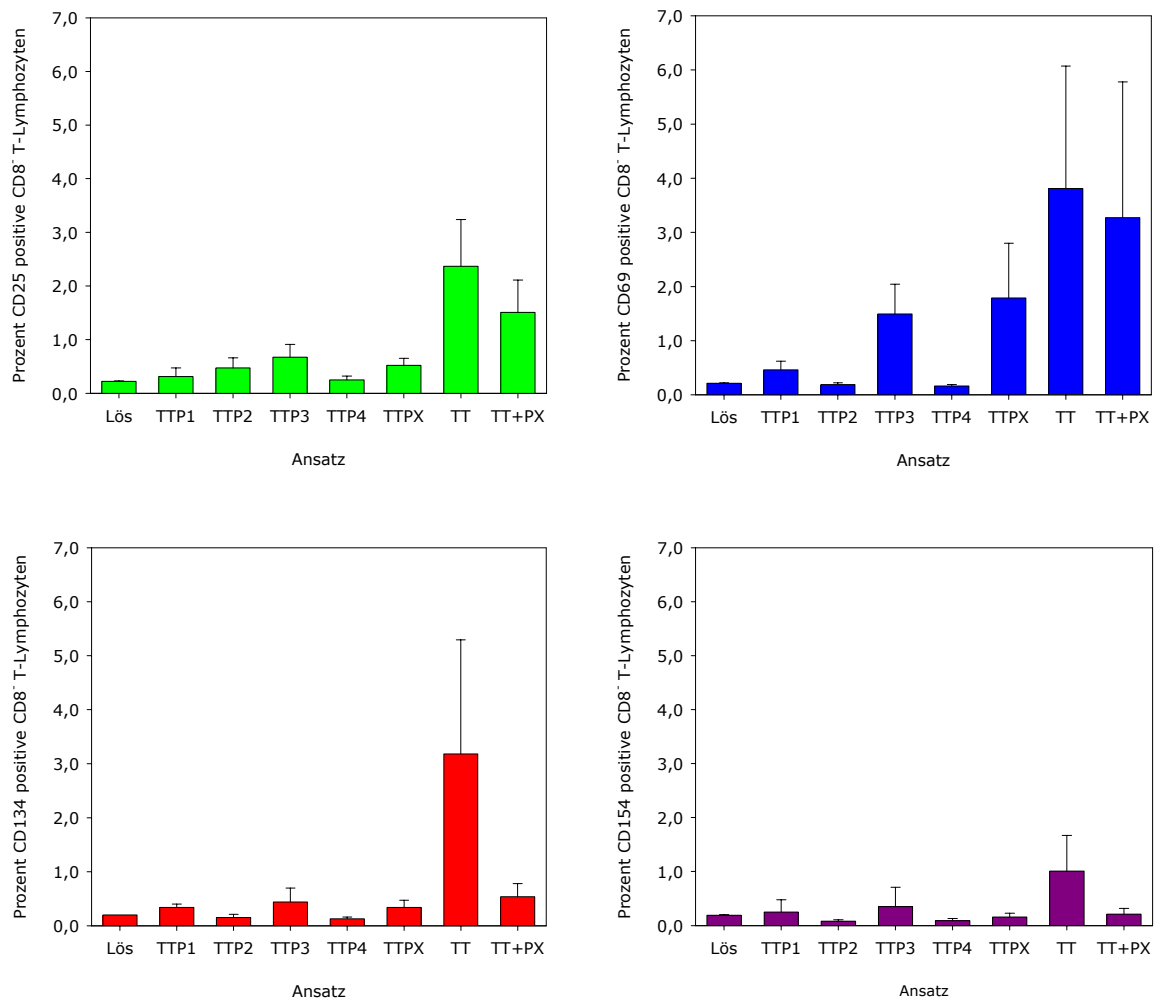


Abb. 3.12: Aktivierte Th-Zellen nach Stimulation mit TT und TT-Peptiden (n = 4; Lös: Lösungsmittelkontrolle, TTPX: alle vier TT-Peptide, TT+PX: TT und alle vier TT-Peptide)

3.1.12 Ermittlung der optimalen TT-Peptidkonzentration

Der erfolgreichen Peptidstimulation des vorherigen Kapitels sollte die Erstellung einer Peptidkonzentrationskurve folgen. Mit dieser sollte abgeklärt werden, in welchem Konzentrationsbereich ein Peptid des TT die antigenspezifischen Th-Zellen optimal stimulieren konnte. Für die Inkubation der Proben wurde aufgrund der limitierten Mengen der übrigen Peptide das TTP1 verwendet.

Methodik: Der Stimulationsansatz wurde mit TTP1 in steigender Konzentration durchgeführt (siehe **2.2.1**). Die Färbung, Messung und Auswertung der Proben erfolgte gemäß **2.2.2** und **2.2.5**.

Ergebnisse: Die Abb. 3.13 zeigt eine Hochregulation von CD25 und CD69 auf den Th-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration an TTP1, während für die Antigene CD134 und CD154 kein Anstieg zu sehen ist.

Die Ergebnisse der CD25-Expression auf den Th-Zellen stellten sich wie folgt dar: Während 5 und 10 µg TTP1 pro ml Endvolumen eher suboptimale Durchschnittswerte (ca. 0,5 % positive Th-Zellen) lieferten, konnte zwischen 20 und 80 µg/ml ein Plateau an aktivierten CD25⁺ Th-Zellen (0,7 – 0,9 %) beobachtet werden. Zwar wurde bei 100 µg/ml mit 1,1 % ein nochmals höherer Mittelwert gemessen, doch erscheint diese Konzentration als zu hoch für eine spezifische Stimulation.

Ein ähnlicher Verlauf an positiven Th-Zellen konnte beim Aktivierungsantigen CD69 gemessen werden. Nach eher suboptimalen Mittelwerten bei 5, 10 und 20 µg/ml TTP1-Konzentration (ca. 0,4 %) wurde das Plateau zwischen 40 und 80 µg/ml mit ca. 0,7 % CD69⁺ Th-Zellen erreicht. Allerdings wurden für dieses Antigensignal wesentlich höhere Standardabweichungen errechnet, und es konnte eine teilweise höhere Expression von CD69 auf den CD8⁺ CTLs gemessen werden (0,2 – 1 %), was nicht der Fall sein dürfte.

Bei den Oberflächenantigenen CD134 und CD154 konnte davon ausgegangen werden, dass die Inkubation mit diesem Peptid in allen Konzentrationsstufen zu keiner Hochregulation führte.

Ausgehend von der Notwendigkeit einer spezifischen Stimulation fiel die Entscheidung für eine Konzentration von 40 µg Peptid pro ml Ansatz. Damit war die in den Stimulationen von **3.1.11** verwendete Peptidkonzentration von jeweils 20 µg/ml ausreichend aber suboptimal. Die verbleibende Peptidstimulationskinetik zur Abrundung der Untersuchungen wurde auch unter dem Aspekt einer weitergehenden Charakterisierung der reaktiven Th-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **3.2.3** dargestellt.

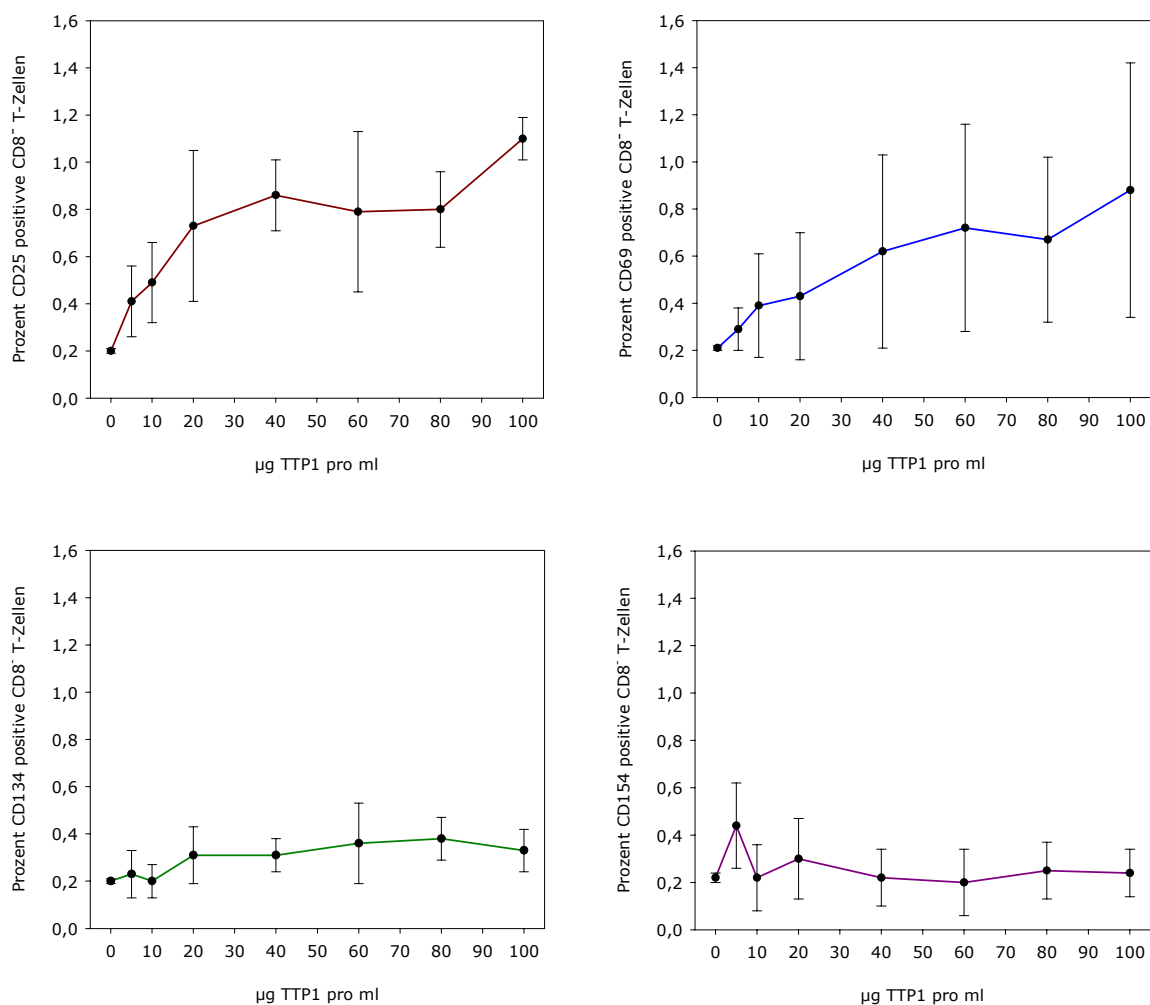


Abb. 3.13: Expressionskurven von vier Aktivierungsantigenen in Abhängigkeit der Konzentration von TTP1 (n = 4)

3.2 Kontrolle der Spezifität der Stimulationen

In diesem zweiten Teil wurden die mittels verschiedener Antigene induzierten Stimulationen auf ihre Spezifität geprüft, da eine T-Zellstimulation auch mit Zytokinen unspezifisch induziert werden kann. Diese sog. Bystander-Aktivierung kann zu einer falsch positiven Antwort führen, die nicht direkt vom Antigen verursacht wird.

Um dies zu überprüfen wurde der optimierte Stimulationsansatz mit TT an Nabelschnurblut durchgeführt, da bei Neugeborenen noch keine Immunantwort gegen dieses Antigen stattgefunden hat. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die bisherigen Ergebnisse mit denen einer Erstantwort vergleichen zu können.

Weiterhin wurden die TT und TT-peptidreaktiven T-Zellen genauer charakterisiert, um die aktivierbaren Subpopulationen definieren zu können. Die Generierung von Effektor T-Zellen aus naiven T-Zellen infolge der Antigenpräsentation und die Entwicklung des Immungedächtnisses sind in **1.3** dargestellt.

Im Kontext einer europäischen Studie wurden farbstoffkonjugierte HLA-Tetramere zur Identifizierung antigenspezifischer T-Zellen in verschiedenen Laboratorien ausgetestet. Dabei wurden die Protokollparameter optimiert und die Ergebnisse zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen verglichen.

3.2.1 Stimulation von Nabelschnurblut mit TT

Mit dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, dass für die Hochregulierung der Aktivierungsantigene auf den T-Zellen im relativ kurzen Stimulationszeitraum von 26 bis 28 h eine vorherige Immunisierung notwendig ist. Die Inkubation von Nabelschnurblutproben, die der Plazenta Neugeborener entnommen worden waren, mit TT sollte zeigen, dass die erstmalige Auseinandersetzung mit diesem Vakzin zu einer geringen Expression der T-Zellaktivierungsantigene führt. Folglich wäre die Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker im gegebenen Zeitraum vom Antigen bedingt und nicht von Effekten unspezifischer Zytokine.

Methodik: Das optimierte Stimulationsprotokoll wurden nach **2.2.1** mit Nabelschnurblut durchgeführt. Die Detektion und Identifizierung der reaktiven T-Zellen erfolgte nach **2.2.2** und **2.2.5** mit bisherigen und neuen Antikörperkombinationen und Auswerteschemata.

Ergebnisse: Die Abb. 3.14 zeigt die erhaltenen Werte des TT-stimulierten Nabelschnurblutes (NSB) im Vergleich mit den Mittelwerten von identisch behandelten Proben geimpfter Kontrollpersonen (KP) aus **3.1.5**.

Die erhaltenen Durchschnittswerte des Nabelschnurbluts ergaben für die Th-Zellen bei Färbung von CD3 und CD8 erwartungsgemäß fast keine Hochregulation der detektierten Aktivierungsantigene. Lediglich beim Antigen CD25 konnte bei einer Probe eine schwache Expression (durchschnittlich 0,52 %) ermittelt werden, während bei den übrigen Antigenen CD69, CD134 und CD154 keine Hochregulation gefunden werden konnte. Die Verteilung der beiden T-Zellsubpopulationen war mit ca. 71 % an CD3⁺/CD8⁻ Th-Zellen und ca. 25 % an CD3⁺/CD8⁺ CTLs den Werten aus Tab. 3.2 für geimpfte erwachsene Probanden sehr ähnlich (verglichen wurden die Werte der PBS-Kontrolle).

Die Färbung der Antigene CD45R0 und CD62L auf allen T-Zellen des Nabelschnurbluts erbrachte die in Tab. 3.3 dargestellte Verteilung:

Population	Kontrolle	Stdabw	TT-stimuliert	Stdabw
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁺	0,96	0,81	1,07	0,99
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁻	0,45	0,45	0,41	0,44
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁺	91,37	1,21	91,67	1,43
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁻	4,08	1,39	3,90	1,43

Tab. 3.3: Prozentwerte der T-Zellpopulation in Nabelschnurblut

Die Tabelle zeigt deutlich, dass in Nabelschnurblut fast nur naive und CD62L⁺ T-Zellen gefunden wurden (vergleiche Werte erwachsener Probanden in Tab. 3.4). Im Cluster der CD45R0⁻/CD62L⁺ T-Zellen konnte wie oben nur für den Aktivierungsmarker CD25 eine Hochregulation auf ca. 0,5 % der T-Zellen detektiert werden. Die übrigen Aktivierungsmarker zeigten keine Hochregulation und die anderen drei Subpopulationen hatten zu geringe Zellzahlen, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mit dem optimierten Stimulationsprotokoll die Detektion einer spezifischen Aktivierung der T-Zellen über deren erhöhte Antigenexpression möglich ist. Eine unspezifische Aktivierung kann innerhalb des Stimulationszeitraums weitgehend ausgeschlossen werden. Weiterhin ist der Großteil der T-Zellen im Nabelschnurblut vom Phänotyp der CD62L⁺ naiven T-Zellen, was die geringe Stimulation erklären könnte.

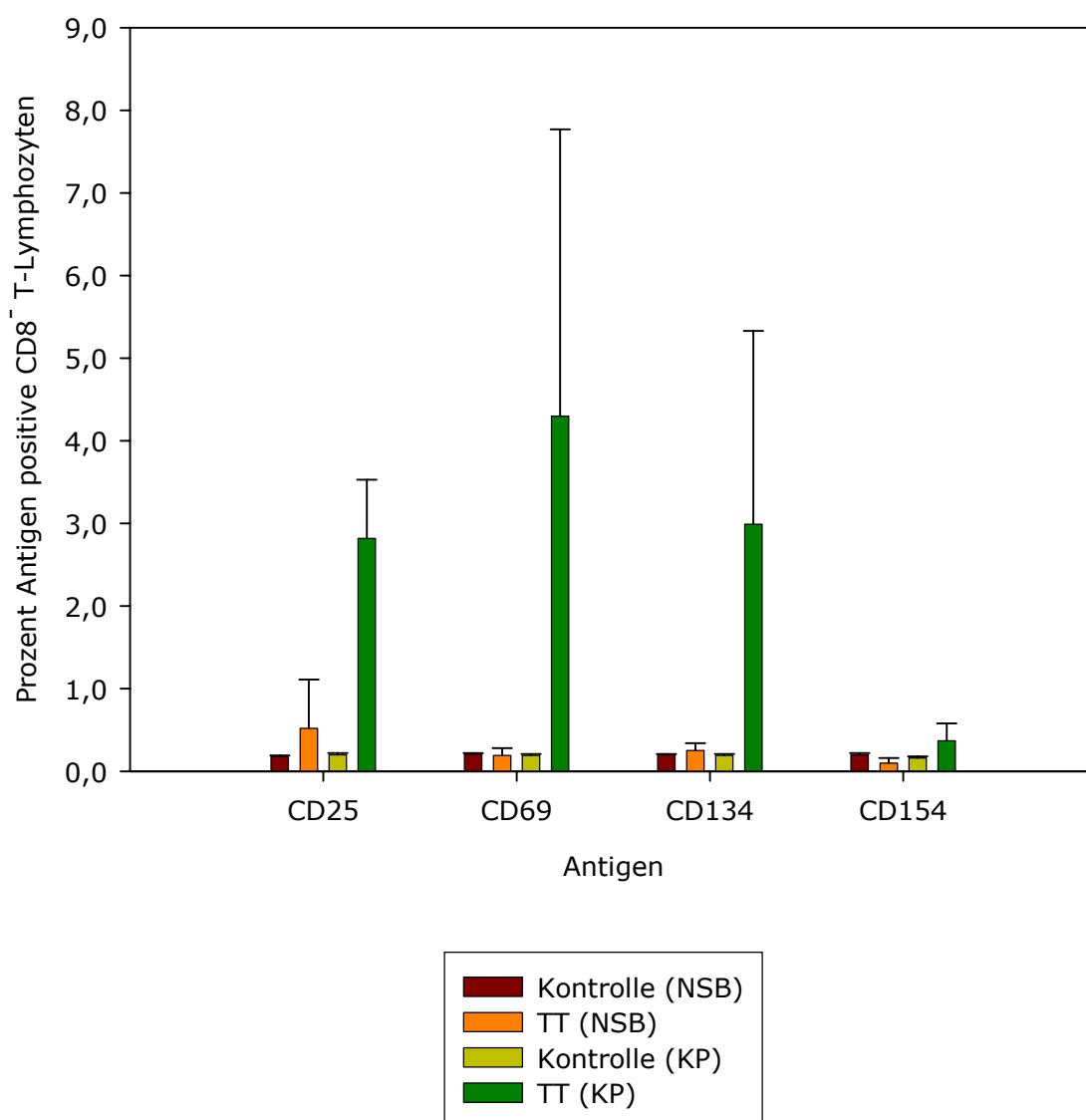


Abb. 3.14: Vergleichende Messung der Oberflächenantigene nach TT-Stimulation von Proben geimpfter und ungeimpfter Probanden (n = 4, KP: Kontrollpersonen, NSB: Nabelschnurblutproben)

3.2.2 Identifizierung der TT-reaktiven Kompartimente

Die Zielsetzung dieses Versuchsblocks war die weitergehende Charakterisierung von TT-spezifischen T-Lymphozyten an geimpften erwachsenen Probanden. In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Stimulation mittels TT hauptsächlich die CD8⁺ Th-Zellen aktivierte, was der Vorstellung über die Abfolge einer Immunantwort entspricht (siehe 1.2.1.2). Die Färbung der T-Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gegen CD45R0 und CD62L sollte klären, aus welcher der vier möglichen Subpopulationen sich die stimulierten und aktivierungsantigenpositiven T-Zellen rekrutieren. Die Bedeutung des Antigens CD45R0 und die Aufteilung der T-Zellen in CD45R0⁺ Memory und CD45R0⁻ naive T-Zellen wurde in 1.3.1 dargestellt. Die Notwendigkeit von CD62L zur Einwanderung der T-Zellen in sekundäres Lymphgewebe und seine nachfolgende Abspaltung wurden ebenfalls geschildert (siehe 1.2.4.2).

Methodik: Der Ansatz erfolgte gemäß 2.2.1, die Färbung und Auswertung wurden entsprechend 2.2.2 und 2.2.5 angepasst.

Ergebnisse: In Tab. 3.4 sind die durchschnittlichen Prozentwerte der vier T-Zellsubpopulationen und ihre Veränderung nach TT-Stimulation aufgeführt. Parallel dazu zeigt die Abb. 3.15 den prozentualen Anteil der antigenpositiven T-Zellen innerhalb der vier Untergruppen.

Population	Kontrolle	Stdabw	TT-stimuliert	Stdabw
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁺	11,25	5,61	11,18	5,28
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁻	9,46	5,10	10,48	5,49
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁺	53,86	11,39	50,69	10,28
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁻	15,02	4,95	17,05	5,83

Tab. 3.4: Prozentwerte der T-Zellsubpopulationen mit und ohne Stimulus (n = 4)

In der Tabelle ist zu sehen, dass infolge der Stimulation bei den naiven T-Zellen ein niedrigerer Mittelwert an CD62L⁺ und eine erhöhte Zahl an CD62L⁻ Zellen gemessen wurde (Δ = +2 % und mehr). Im Cluster der Memory T-Zellen waren nur geringere Änderungen messbar (Δ = +1 % und weniger). Aufgrund der hohen Standardabweichungen können diese Ergebnisse aber nur relativ gesehen werden.

Die Abb. 3.15 zeigt für das Antigen CD25 eine gesteigerte Expression bei drei der vier differenzierten Subpopulationen. Die beiden Populationen der Memory T-

Zellen ergaben jeweils ca. 1,5 % mehr CD25⁺ Zellen. Bei den CD62L⁺ naiven T-Zellen konnten nach der TT-Stimulation ein Anstieg von ca. 2 % gemessen werden. Einzig die CD62L⁻ naiven T-Zellen regulierten CD25 kaum hoch.

Beim Antigen CD134 erfolgte die erhöhte Expression hauptsächlich bei den Memory T-Zellen. Der messbare Anstieg betrug bei den CD62L⁺ Memory T-Zellen ca. 2 % und bei den CD62L⁻ ca. 3,5 %. Innerhalb der naiven T-Zellen konnte für beide Subpopulationen nur eine Differenz von jeweils unter 1 % zwischen den Kontrollen und den stimulierten Ansätzen gemessen werden.

Die detektierten Unterschiede in der Expression von CD154 nach TT-Stimulation waren vergleichsweise gering. Nur bei den CD62L⁻ Memory T-Zellen regulierten ca. 2 % das Antigen hoch, während die übrigen drei Untergruppen keine oder nur minimale Veränderungen in der CD154-Expression zeigten.

Die erhaltenen Resultate ergeben als Fazit, dass die aktivierten Th-Zellen hauptsächlich zur Population der Memory T-Zellen gehören. Dies deckt sich mit der Vorstellung, dass diese T-Zellen das Immungedächtnis bilden, das im Fall einer erneuten Auseinandersetzung mit einem bekannten Antigen für die Immunreaktion zuständig ist. Desweiteren erklärt die Hauptreaktivität der Memory T-Zellen die geringe Stimulation von Nabelschnurblut, das nur wenige Zellen dieses Typs enthält. Eine nachfolgende identische Studie sollte auch die peptidreaktiven T-Zellen näher charakterisieren.

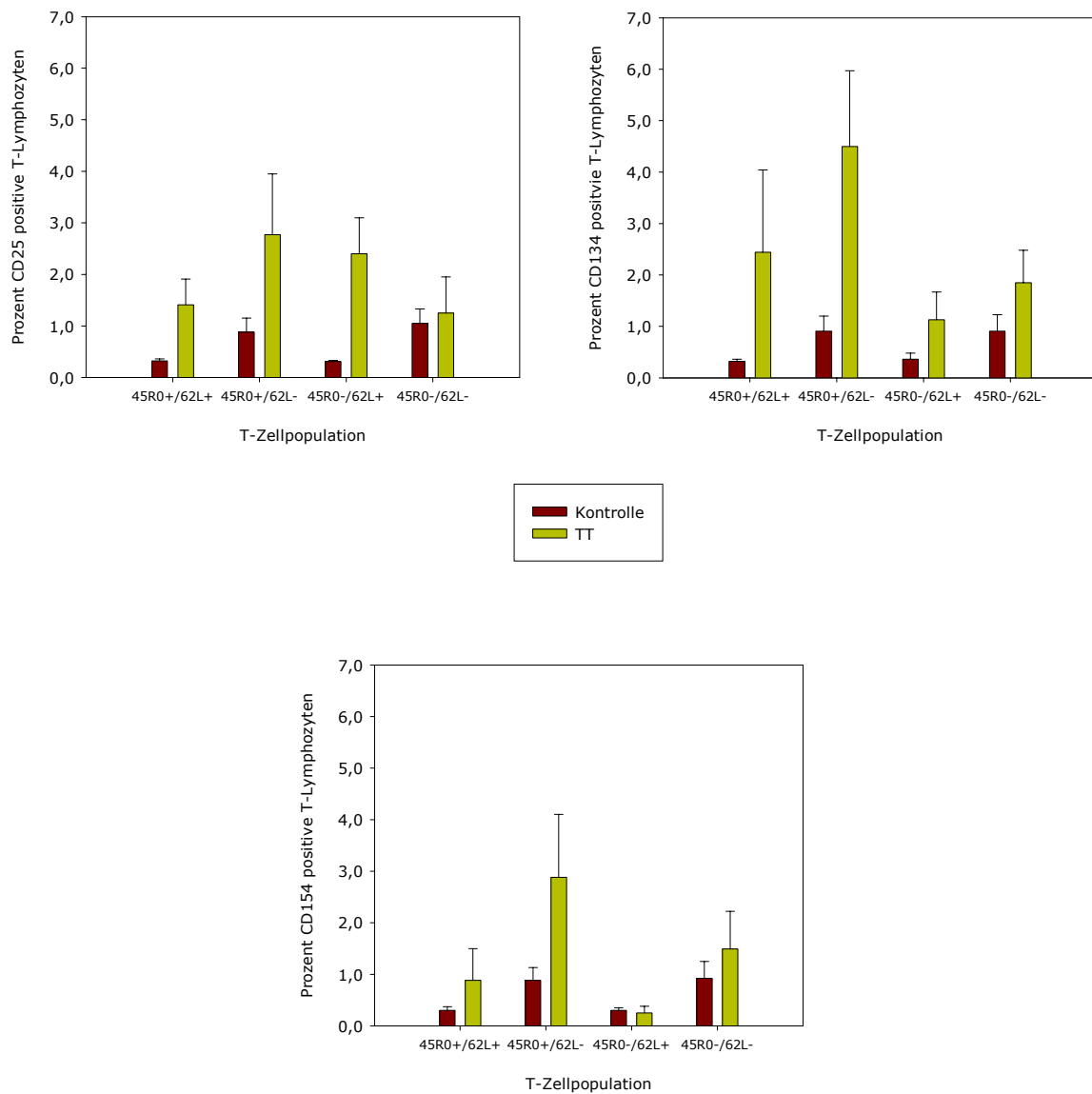


Abb. 3.15: Antigenpositive T-Zellen in vier Subpopulationen nach TT-Stimulation (n = 4)

3.2.3 Peptidkinetik und peptidreaktive Kompartimente

In dieser Versuchsreihe sollten zwei Punkte gleichzeitig behandelt werden. Zum einen sollte der Zeitverlauf der Antigenexpression auf den T-Zellen im optimierten TT-Peptidstimulationsprotokoll untersucht werden. Zum anderen sollten dabei die reaktiven T-Zellen auf ihre Expression von CD45R0 und CD62L charakterisiert werden. Die Zugehörigkeit der peptidreaktiven T-Zellen zur Subpopulation der Th-Zellen konnte bereits gezeigt werden (siehe **3.1.11** und **3.1.12**).

Methodik: Die Stimulationskinetik mit TTP1 wurde entsprechend Kapitel **2.2.1** durchgeführt. Die Detektion und Identifikation der reaktiven T-Zellen erfolgte nach **2.2.2** und **2.2.5**.

Ergebnisse: Die Verteilung der vier T-Zellsubpopulationen nach der längsten Stimulationsdauer von 30 h ist in Tab. 3.5 aufgeführt. Die Abb. 3.16 bis 3.19 zeigen den Zeitverlauf der vier gemessenen Aktivierungsantigene auf den vier Subpopulationen.

Population	Kontrolle	Stdabw	TTP1-stimuliert	Stdabw
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁺	16,89	2,20	17,82	2,07
CD45R0 ⁺ /CD62L ⁻	16,09	4,73	15,61	5,32
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁺	54,81	8,14	54,07	8,57
CD45R0 ⁻ /CD62L ⁻	5,14	3,35	5,14	3,35

Tab. 3.5: Prozentwerte der T-Zellsubpopulationen (n = 4)

Die Tabelle demonstriert, dass die Stimulation mit dem Peptid TTP1 selbst nach 30 h zu keinen wesentlichen Veränderungen der durchschnittlichen Prozentanteile führte. Einzig die CD62L⁺ Memory T-Zellen steigerten ihren Anteil um ca. 1 %, während die gemessenen Unterschiede bei den übrigen drei Subpopulation unter 1 % lagen. Relativiert werden diese Prozentwerte zusätzlich durch die vergleichsweise hohen Standardabweichungen analog Tab. 3.4.

Eine erhöhte Expression des Antigens CD25 infolge Peptidstimulation konnte auf drei der vier Subpopulationen detektiert werden. Diese erfolgte jedoch immer erst nach 24 h und steigerte sich bei den CD62L⁺ Memory T-Zellen von ca. 1,5 % auf knapp 3 % nach 30 h. Von den CD62L⁺ naiven T-Zellen waren hingegen nach 24 h zu allen Zeitpunkten ca. 1,5 % der Zellen CD25⁺. Unter den CD62L⁻ Memory

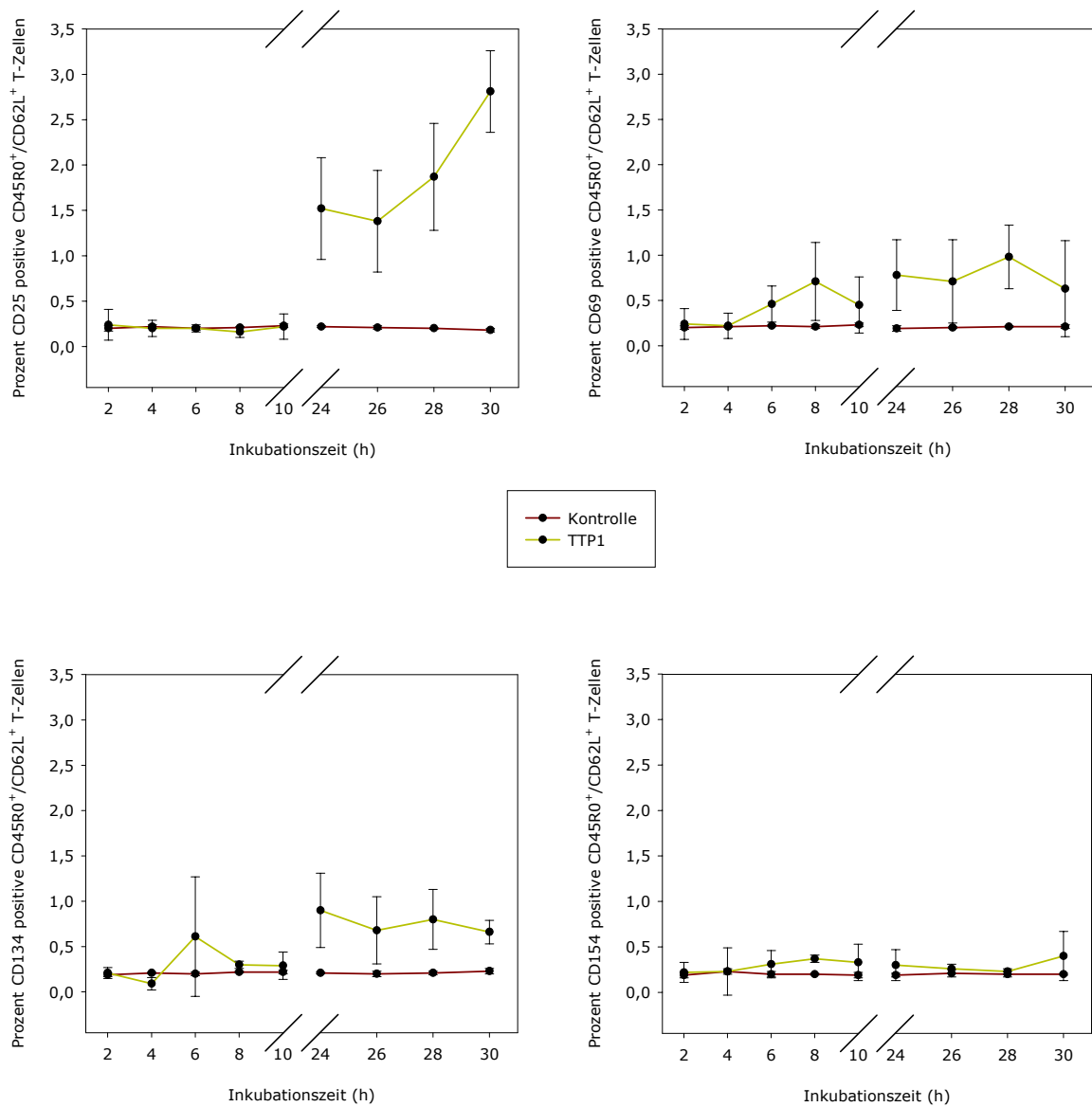
T-Zellen exprimierten infolge Stimulation nur weniger als 1 % das Antigen erhöht.

Die Messung des Aktivierungsmarkers CD69 erbrachte nur auf den CD62L⁻ Memory T-Zellen eine deutliche Hochregulation mit 1,6 bis 2,8 % positiver Zellen in Begleitung relativ hoher Fehlerbalken. Auf den übrigen drei Subpopulationen konnten nach 24 – 30 h kaum mehr als 1 % CD69⁺ T-Zellen detektiert werden. Nur bei den CD62L⁺ Memory T-Zellen konnte man von einer stabilen aber niedrigen Hochregulation ausgehen (0,6 – 0,9 %). Außerdem konnten auch im Zeitraum von 6 bis 10 h erhöhte Werte für dieses Antigen bei drei T-Zell-subpopulationen gemessen werden, was dem Charakter von CD69 als frühes Aktivierungsantigen entspricht.

Als CD134⁺ T-Zellen konnten infolge der TTP1-Stimulation nur Memory T-Zellen identifiziert werden. Dabei exprimierten die CD62L⁺ und CD62L⁻ Subpopulationen das Antigen nach 24 bis 30 h auf ca. 0,5 bis 1 % der T-Zellen. Die naiven T-Zellen exprimierten CD134 nach Peptidstimulation nicht höher als in den Kontrollen.

Das Antigen CD154 wurde auf keiner der vier T-Zellgruppen durch die Inkubation mit dem TT-Peptid hochreguliert. Eine Detektion der Peptidaktivierung ist mit diesem Antigen offensichtlich nicht möglich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Peptidstimulation über Nacht zu einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD134 führt. Die Expression von CD69 steigt bereits nach 6 h an, wenngleich für eine sichere Detektion der Aktivierung die Inkubation über Nacht nötig ist. Ähnlich der Stimulation mit TT kann das Signal von CD25 nach Peptidgabe auf drei von vier Subpopulationen und das Signal von CD134 nur auf den beiden Memory-Subpopulation gemessen werden. Die Aktivierung bestimmter T-Zellen demonstriert dabei die Spezifität der Stimulation mit dem TTP1.

Abb. 3.16: TTP1-Stimulationskinetik der CD45R0⁺/CD62L⁺ T-Zellen

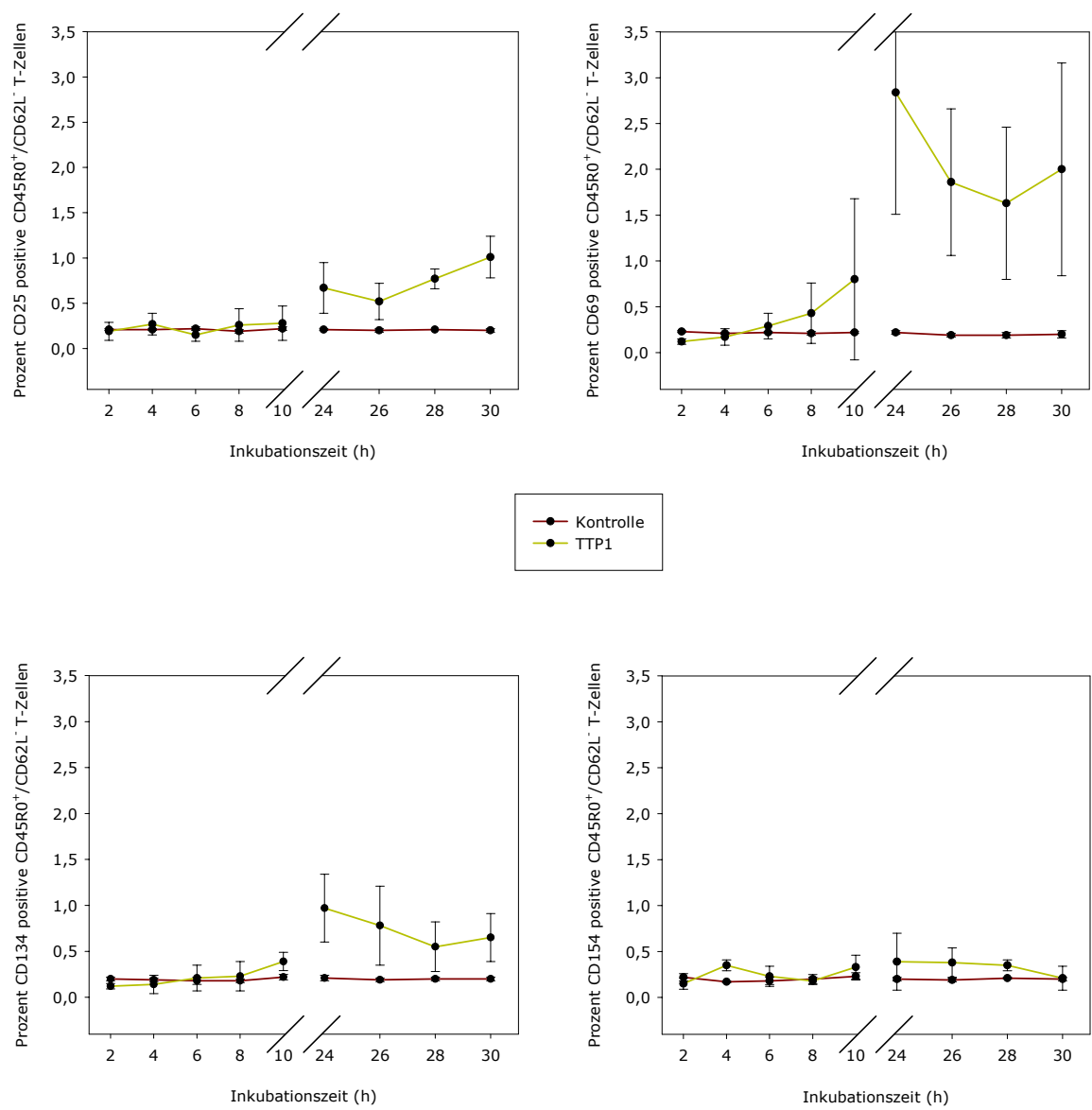
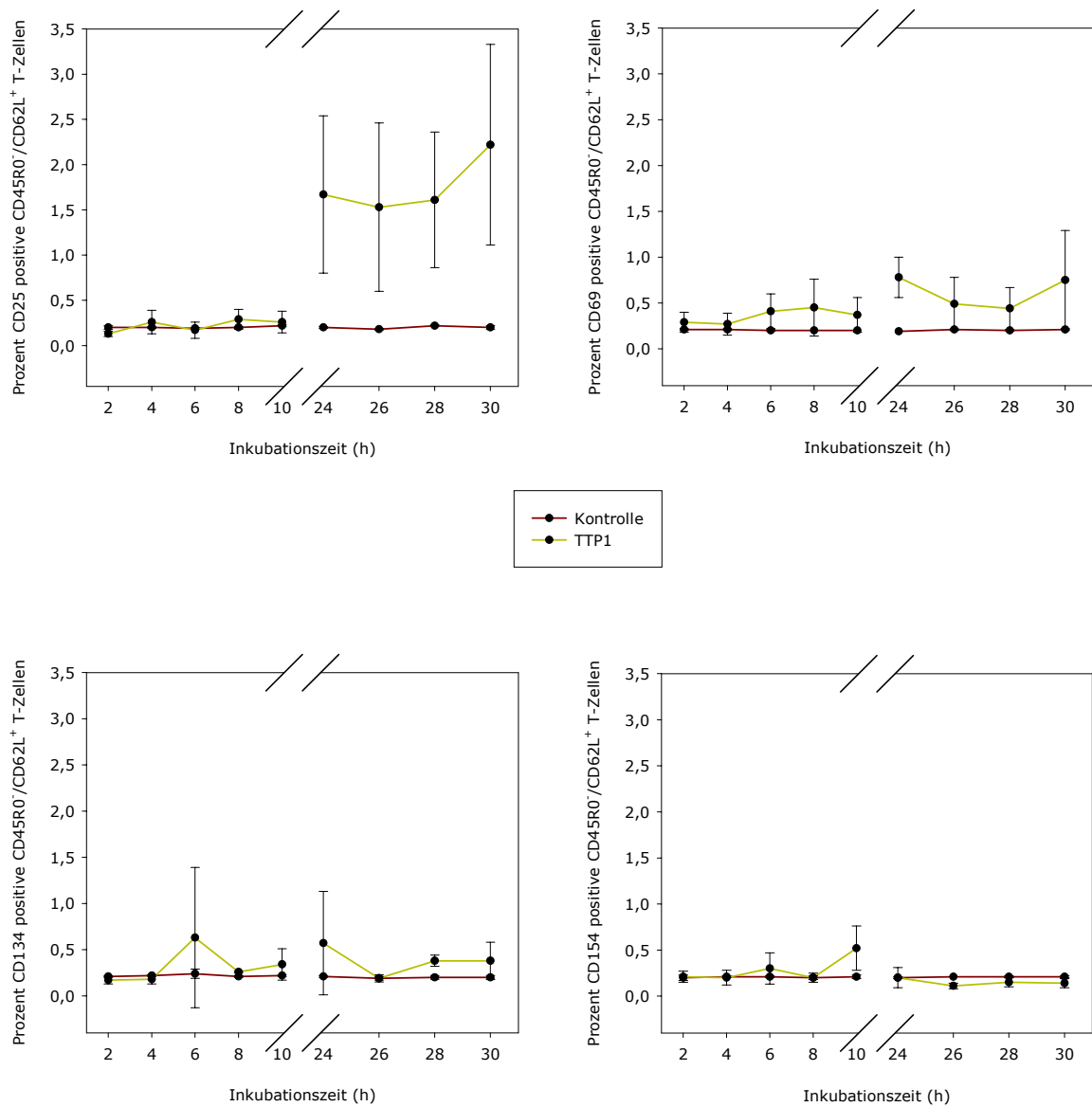
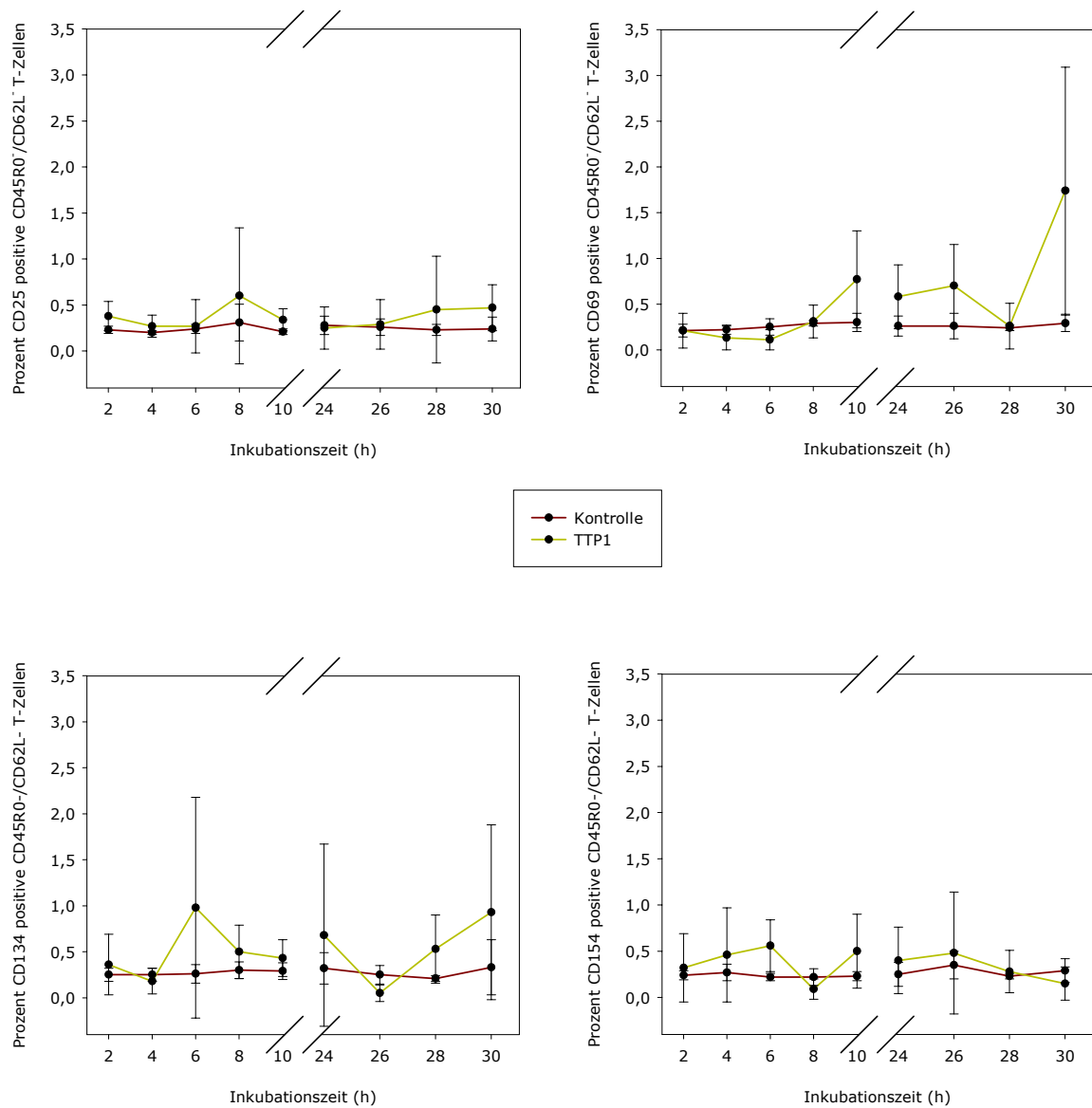


Abb. 3.17: TTP1-Stimulationskinetik der CD45R0⁺/CD62L⁻ T-Zellen

Abb. 3.18: TTP1-Stimulationskinetik an CD45R0⁺/CD62L⁺ T-Zellen

Abb. 3.19: TTP1-Stimulationskinetik an CD45R0⁺/CD62L⁻ T-Zellen

3.2.4 Detektion CMV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten

Parallel zu den Experimenten der spezifischen T-Zellstimulation wurden auch Ringversuche durchgeführt, die von der Europäischen Arbeitsgruppe für klinische Zellanalyse (EWGCCA) veranstaltet wurden. Das Ziel dieser Ringversuche war hauptsächlich die Klärung methodischer Aspekte des Färbe- und Messprotokolls zur Detektion CMV-spezifischer CTLs mithilfe von HLA-Tetrameren.

Bei den HLA-Tetrameren handelt es sich um rekombinant exprimierte MHC-I- oder MHC-II-Moleküle, die mit einem bekannten Peptid beladen werden [8; 10; 207]. Diese Moleküle können spezifisch an den jeweiligen TCR binden, jedoch ist die Affinität eines einzelnen Moleküls zu niedrig [251]. Daher werden die Moleküle an Biotin gekoppelt und mit Streptavidin zu einem Tetramer verknüpft. Die Kopplung des Tetramers an ein Fluorochrom ermöglicht die Identifizierung antigenspezifischer T-Zellen in der Durchflusszytometrie [9; 205].

Um CMV-spezifische CTLs im Vollblut von Probanden mit dem HLA-A2-Typ im DFZ zu identifizieren, werden HLA-A2-Moleküle mit dem Nonapeptid pp65 aus dem Hüllprotein des CMV beladen und diese zu PE gekoppelten Tetrameren verknüpft. In ersten Studien wurden diese Tetrameren erfolgreich eingesetzt, um die Gefahr von lebensbedrohlichen Komplikationen durch CMV bei transplantierten Patienten abschätzen zu können [96; 130].

Die Austestung dieser pp65 gekoppelten HLA-A2-Tetrameren in verschiedenen Labors sollte, mit Blick auf eine spätere Anwendung in der klinischen Routine, die Zuverlässigkeit des Reagenz und die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse demonstrieren.

Methodik: Die Detektion der spezifischen CTLs und die Bestimmung ihrer Zellzahl wurden nach **2.2.2** und ihre Identifizierung gemäß **2.2.5** durchgeführt.

Ergebnisse: In Abb. 3.20 sind die Zellzahlen der vier CTL-Subpopulationen von fünf Probanden, gemessen an drei Folgetagen, dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Großteil der CTLs die Tetrameren nicht gebunden hatte. Innerhalb dieser Hauptpopulation konnte auf etwa der Hälfte der CTLs das Antigen CD57 gemessen werden. Dabei reichten bei den Proben Nr. 1, 2, 4 und 5 die Mittelwerte der CD57⁻ CTLs von 140 bis 330 Zellen pro μ l Vollblut und die Zellzahlen der CD57⁺ CTLs von 78 bis 430/ μ l.

Eine Ausnahme stellte Probe Nr. 3 dar: Bei diesem Proband waren im Vollblut sehr viele CTLs negativ für CD57 (1030/ μ l) und nur wenige CTLs positiv für dieses Antigen (30/ μ l). Die Ergebnisse können damit erklärt werden, dass

Proband Nr. 3 keine CMV-Infektion durchgemacht hatte, und in seinem Serum keine CMV-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Das Antigen CD57 ist ein Aktivierungsmarker und wird auf den CTLs bei viralen Infekten hochreguliert.

Demgegenüber ergaben sich für die CTLs, die die Tetrameren gebunden hatte, nur niedrige Werte. Während im Bereich der CD57⁻/Tetramer⁺ CTLs zwischen 2 und 9 Zellen pro μ l Vollblut gezählt werden konnten, waren die Schwankungen bei den CD57⁺/Tetramer⁺ CTLs mit 2 bis 11 Zellen pro μ l etwas höher. Der Anteil dieser Zellen lag damit im einstelligen Prozentbereich. Auch bei Proband Nr. 3 konnten CTLs gefunden werden, die mit den Tetrameren reagierten (2 und 3 pro μ l Vollblut), was eine gewisse unspezifische Bindung andeutet. Eine klare Trennung zwischen dem CMV⁻ Proband Nr. 3 und den vier übrigen CMV⁺ Probanden ist aufgrund der Tetramerbindung alleine nicht möglich.

Die Tetramertechnik stellt eine einfache und schnelle Methode zur Detektion von CMV-spezifischen CTLs dar. Jedoch muss für die erprobten Reagenzien der HLA-Typ des Probanden bekannt sein, weil diese nur für den Typ HLA-A2 geeignet sind. Da für die Identifizierung von GAD-reaktiven (und TT-reaktiven) T-Zellen keine HLA-Tetrameren verfügbar sind, erfolgte in den nachfolgenden Versuchsreihen ihre Identifikation über die Peptidstimulation mit dem etablierten Protokoll.

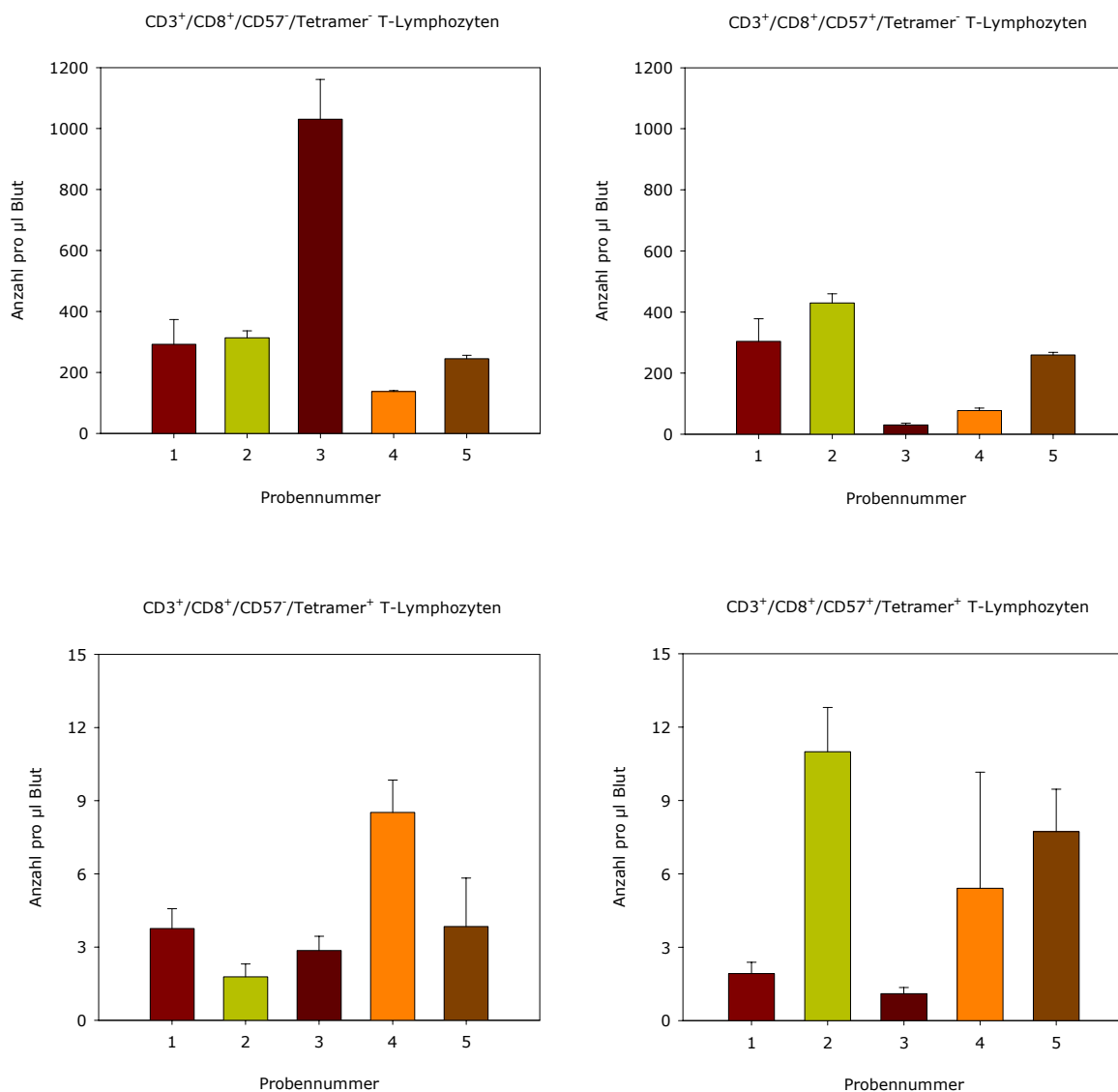


Abb. 3.20: Zellzahl der CTL-Subpopulationen im Vollblut von fünf Probanden (n = 3)

3.3 Anwendung im IDDM-System

In diesem dritten Teil sollten die Erkenntnisse aus den beiden vorherigen Kapiteln zur Stimulierung und Detektion aktivierter und TT-spezifischer T-Zellen auf GAD-reaktive T-Zellen übertragen werden.

Ein Ersatz des TT durch das GAD-Gesamtprotein konnte nicht erfolgen, da die kommerziell erhältliche, in *Drosophila spec.* rekombinant exprimierte GAD wahrscheinlich verunreinigt ist, und damit eine zum Teil unspezifische Stimulation erfolgen würde [94]. Aus diesem Grund sollten zur Stimulation der Vollblutproben von Diabetes Typ I-Patienten und gesunden Probanden einzelne Peptide der GAD synthetisiert und herangezogen werden.

Die ersten beiden Versuchsreihen sollten dazu dienen, die Stimulationsdauer für eine sichere Detektion GAD-spezifischer T-Zellen zu ermitteln. Eine Inkubation über einen Tag wie bei den TT-Peptiden musste aufgrund der wesentlich niedrigeren Frequenz der GAD-spezifischen T-Zellen deutlich verlängert werden.

Um unspezifische Aktivierungen zu vermeiden, sollte mittels HLA-Typisierung sichergestellt werden, dass in der abschließenden Stimulationsreihe sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollpersonen der Anteil der korrekten positiven Stimulationen deutlich überwiegen würde. Der Vergleich dieser beiden Personengruppen sollte mögliche Unterschiede erkennbar machen.

Der bisherige Kenntnisstand über die Pathogenese des IDDM wurde in **1.1.2.1** zusammengetragen.

3.3.1 Stimulation mit GAD-Peptiden für einen bis fünf Tage

Das Ziel dieser Stimulationsreihe sollte die Definition des besten Zeitraums für die optimale Detektion GAD-spezifischer Lymphozyten sein. Es wurde dabei angenommen, dass die bisherige Inkubationsdauer mit Peptiden von ca. 26 h für diesen Ansatz nicht ausreichend ist. Daher wurden die Blutproben von Diabetes Typ I-Patienten über fünf Tage mit 11 Peptiden aus der Sequenz der humanen GAD und zwei Kontrollpeptiden inkubiert. Die tägliche Messung sollte ihren Schwerpunkt bei den Aktivierungsantigenen haben, weshalb die T-Lymphozyten in dieser Versuchsreihe nicht direkt identifiziert wurden.

Die Peptide GP01 bis GP11 sind 20mere aus der Sequenz der humanen GAD (siehe **7**, die rot markierte Aminosäure in GP02 wurde falsch synthetisiert). Sie sind bereits erfolgreich zur Gewinnung reaktiver T-Zellklone verwendet worden [95; 369]. Die Unbrauchbarkeit des rekombinanten gesamten GAD-Proteins aufgrund von Verunreinigungen wurde bereits erläutert (siehe **3.3**).

Als Positivkontrolle sollte das Peptid TTP1 dienen, da es bisher bei fast jeden gemessenen Probanden zu einer Hochregulation der Aktivierungsmarker (vor allem CD25) auf den T-Lymphozyten geführt hatte. Dagegen sollte das Peptid NCP als Negativkontrolle keine Reaktion hervorrufen, da es eine rückwärts synthetisierte Sequenz aus dem Hüllprotein des Cocksackievirus enthält. Es ist beschrieben, dass dieses Hüllprotein und die GAD eine partiell homologe Sequenz haben [20].

Methodik: Der Stimulationsansatz wurde nach **2.2.1** durchgeführt, die Messung und Identifizierung erfolgte wie in **2.2.2** und **2.2.5** beschrieben.

Ergebnisse: Die Abb. 3.21 bis 3.26 zeigen die antigenpositiven Lymphozyten, die entweder über CD4 oder CD45RA unterteilt wurden. Es wurden für die Aktivierungsantigene teilweise sehr hohe Prozentwerte mit entsprechenden Standardabweichungen gemessen. Generell kann jedoch von einer spezifischen Stimulation gesprochen werden, da sich beim Peptid NCP meist keine Erhöhung in der Expression der untersuchten Aktivierungsmarker ergab.

Das Aktivierungsantigen CD25 exprimierten vor allem die CD4⁺ Lymphozyten (siehe Abb. 3.21). Während bei den Peptiden GP03, GP06, GP07, GP09, GP10, GP11 und NCP nur Mittelwerte unter 0,7 % gemessen werden konnten, ergab sich bei den übrigen GAD-Peptiden eine teilweise deutliche Hochregulation von CD25 (bis 1,9 %). Die höchsten Durchschnittswerte wurden meistens nach 3 bis 4 Tagen erreicht.

Dagegen erbrachten die CD4⁻ Lymphozyten nur bei 3 Peptiden hohe Einzelwerte, weshalb in dieser Subpopulation von keiner Stimulation ausgegangen werden kann.

Bei den Messungen der CD45RA^{+/-} Lymphozyten konnten die Ergebnisse der CD4⁺ Lymphozyten bezüglich ihrer CD25-Expression nicht wiederholt werden (siehe Abb. 3.22): Im Bereich der CD45RA⁺/CD25⁺ Lymphozyten konnten nur bei den beiden Peptiden GP04 und GP08 deutlich erhöhte Werte gemessen werden (bis zu 3,3 %). Die hohen Fehlerbalken deuten jedoch auf hohe Einzelwerte hin. Demgegenüber stimulierte TTP1 als Positivkontrolle ca. 1 % der CD45RA⁺ Lymphozytenpopulation.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei den CD45RA⁻/CD25⁺ Lymphozyten erhalten: Hier konnten bei 3 Peptiden erhöhte Werte gemessen werden. Die Peptide TTP1 (bis 1,7 %), GP04 (bis 1,7 %) und GP08 (bis 3,4 %) führten vor allem nach 3 Tagen und mehr zu erhöhten Prozentzahlen.

Die Intrazellulärmessung der IFN- γ -Expression lieferte bei der CD4⁺ Population lediglich beim Peptid GP08 eine mit der Inkubationsdauer steigende Detektierbarkeit (von 0,3 bis 3,5 %, siehe Abb. 3.23). Diese Hochregulation von IFN- γ konnte auch bei den CD4⁻ Lymphozyten für GP04 und GP08 (bis 2,2 bzw. 5,9 %) gemessen werden. Bei allen übrigen Ansätzen konnte kein Unterschied zu den Lösungsmittelkontrollen festgestellt werden.

Die Messungen von IFN- γ bei den CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Lymphozyten lieferten sehr ähnliche Werte (siehe Abb. 3.24). Allerdings wurden höhere Standardabweichungen errechnet, weil die entsprechenden Stimulationen nicht bei allen vier Proben detektierbar waren. Trotzdem wurden die teilweise hohen Werte der IFN- γ ⁺ Zellen nur bei den beiden Peptiden GP04 und GP08 detektiert.

Beim Zytokin IL-10 ergaben sich deutlich heterogenere Mittelwerte: Während bei den CD4⁻ Lymphozyten maximal 2 % als IL-10⁺ identifiziert werden konnten, wurde unter den CD4⁺ Lymphozyten ein Anteil von bis zu 5,5 % gemessen (siehe Abb. 3.25). Vor allem am Tag 2 ergaben sich hohe Mittelwerte und Fehlerbalken. Auch für die Negativkontrolle des NCP-Ansatzes wurden höhere Werte (bis 0,7 %) gemessen als in den Lösungsmittelkontrollen.

Im Bereich der IL-10⁺/CD45RA⁺ Lymphozyten ergaben die Messungen der meisten Ansätze nur einzelne hohe Werte (siehe Abb. 3.26). Dagegen exprimierten die CD45RA⁻ Lymphozyten das IL-10 in fast allen Ansätzen kaum gesteigert.

Aus dieser umfangreichen Messreihe können mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden: Die Gesamtschau aller Aktivierungsantigene sämtlicher Populationen und stimulierender Peptide zeigt einen optimalen Inkubationszeitraum zwischen drei und vier Tagen. Weiterhin lassen die Resultate des IL-10 darauf schließen, dass hier eine eher unspezifische Hochregulation respektive Antikörperbindung erfolgt ist. Vor allem der Ansatz mit NCP, bei dem keine Stimulation erfolgen sollte, beweist dies. Das Fehlen der eindeutigen T-Zell-identifikation über CD3-Antikörper gibt den Ergebnissen darüber hinaus eine weitere Unsicherheit, da im niedrigen SSC-Bereich der Lymphozyten auch andere Leukozyten liegen, die Zytokine und Aktivierungsmarker synthetisieren können. Für die folgende Stimulationskinetik sollte die Färbung von IL-10 gestrichen und die von CD3 wieder aufgenommen werden. Außerdem sollte die Spezifität der Stimulation überprüft werden, indem die Probanden HLA-typisiert werden und die Ergebnisse mit der Bindungsspezifität der Peptide verglichen werden sollten.

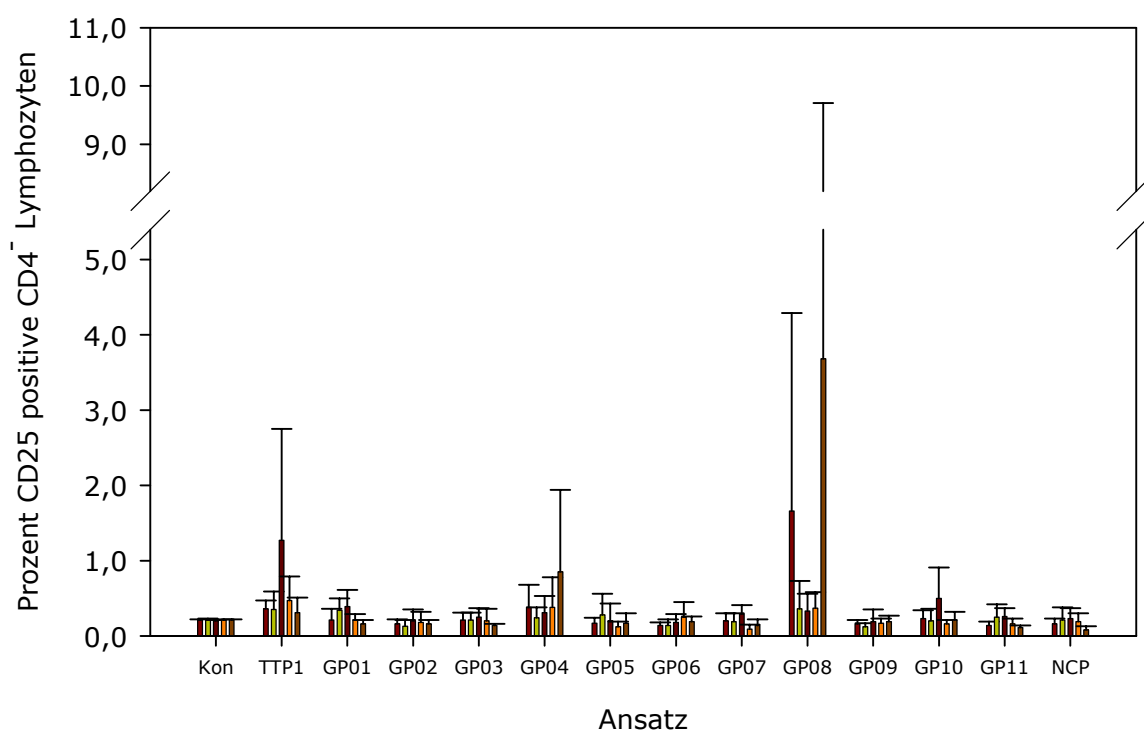
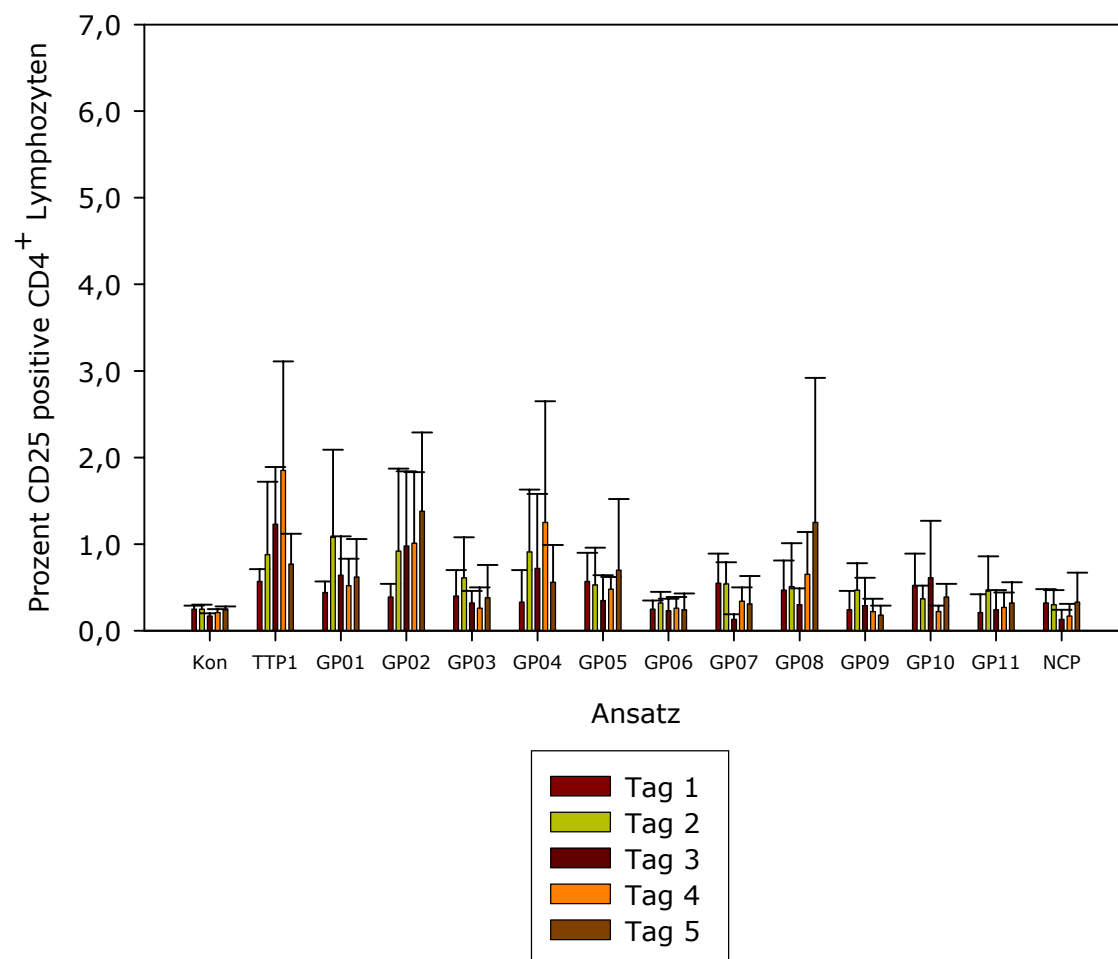


Abb. 3.21: Expression von CD25 auf den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

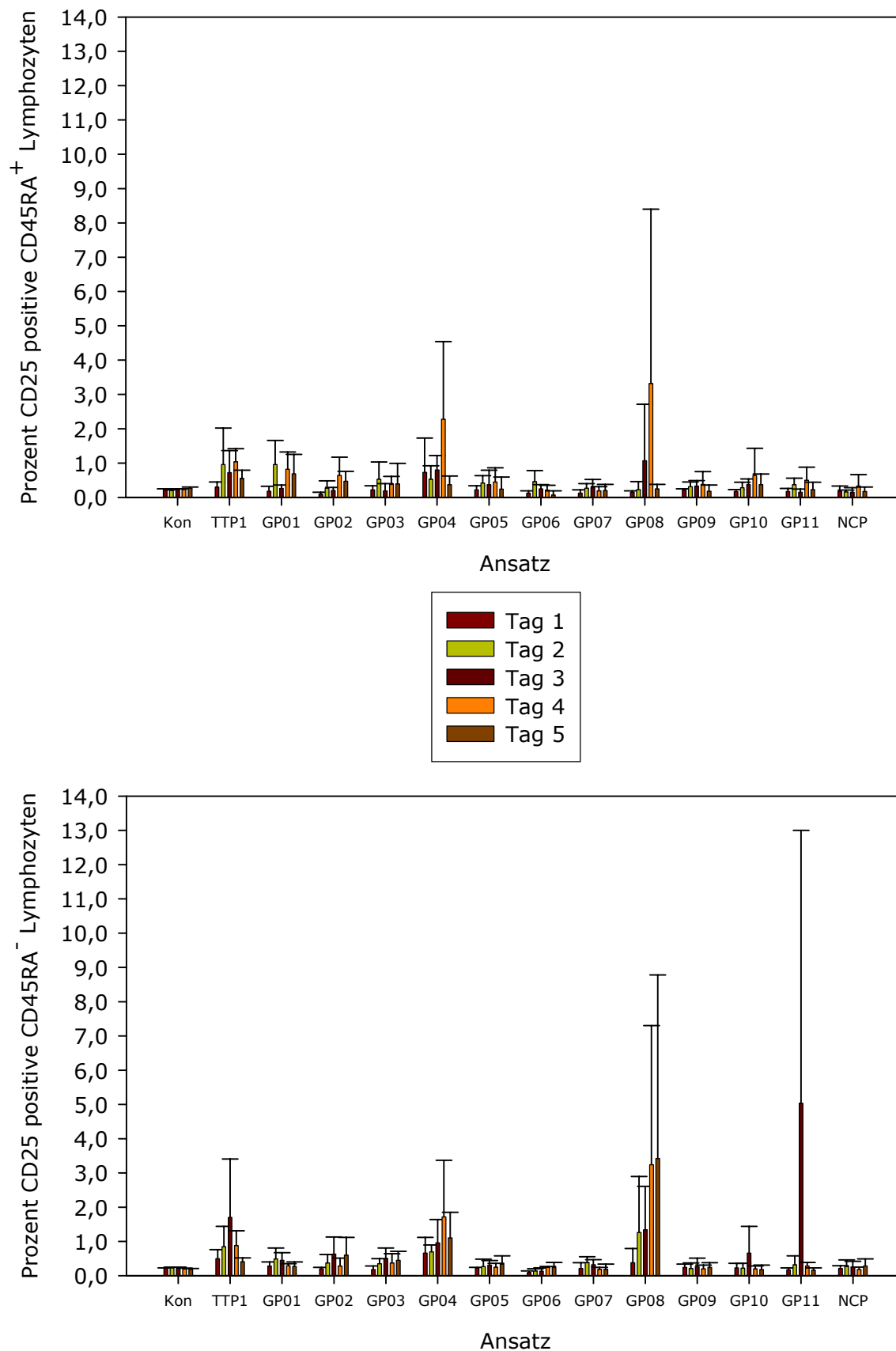


Abb. 3.22: Expression von CD25 auf den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

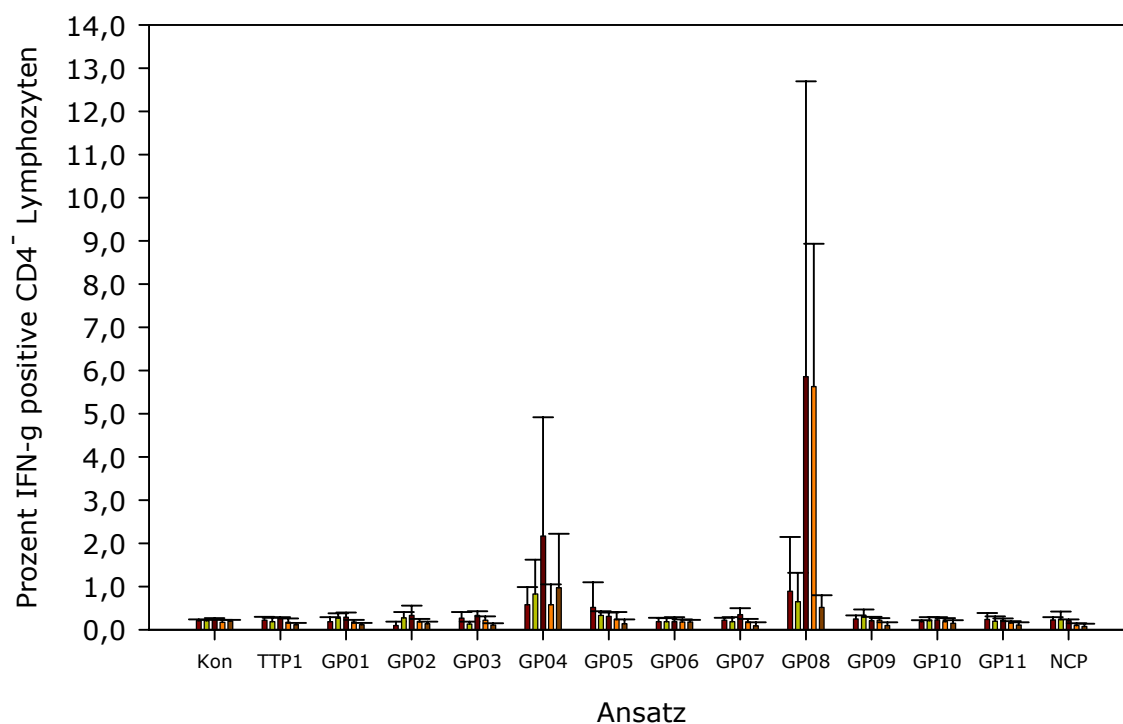
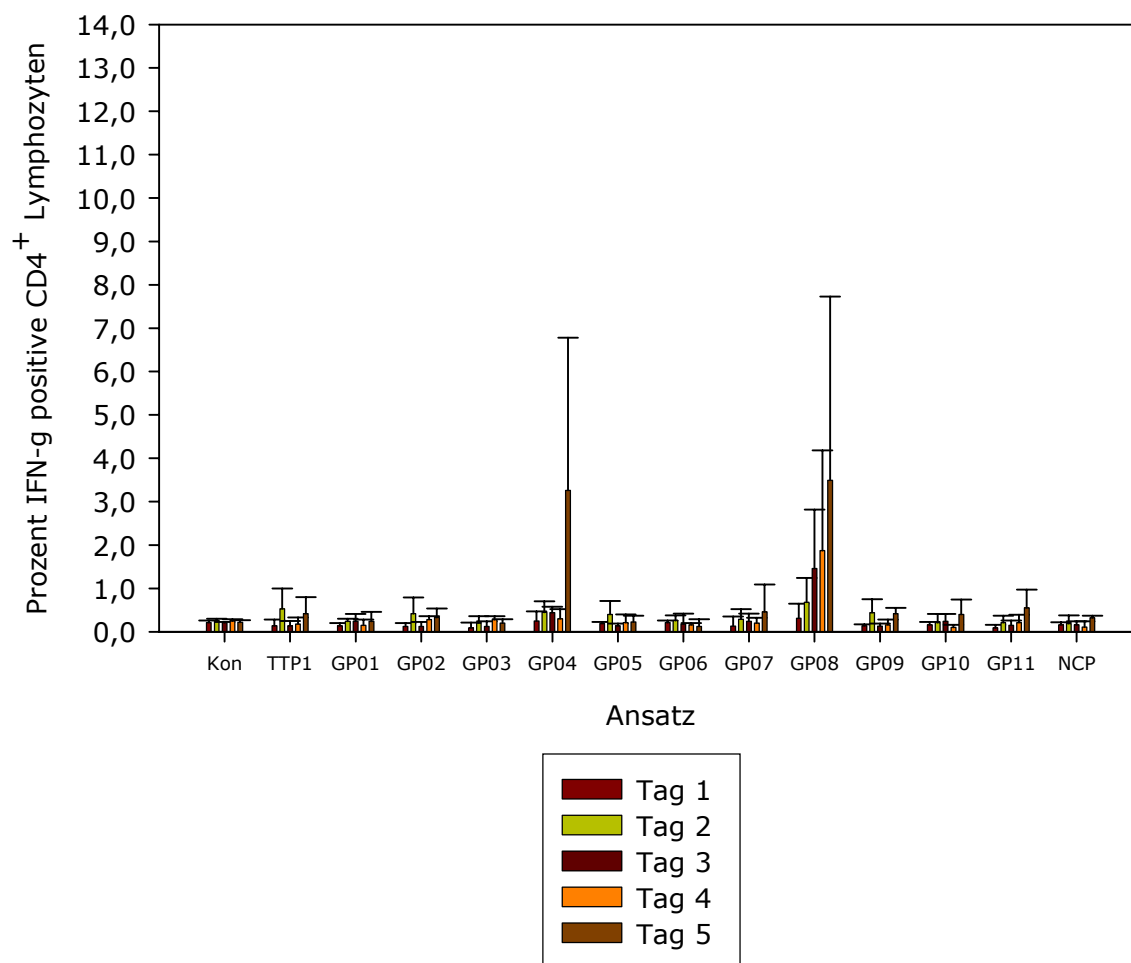


Abb. 3.23: Expression von IFN- γ in den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

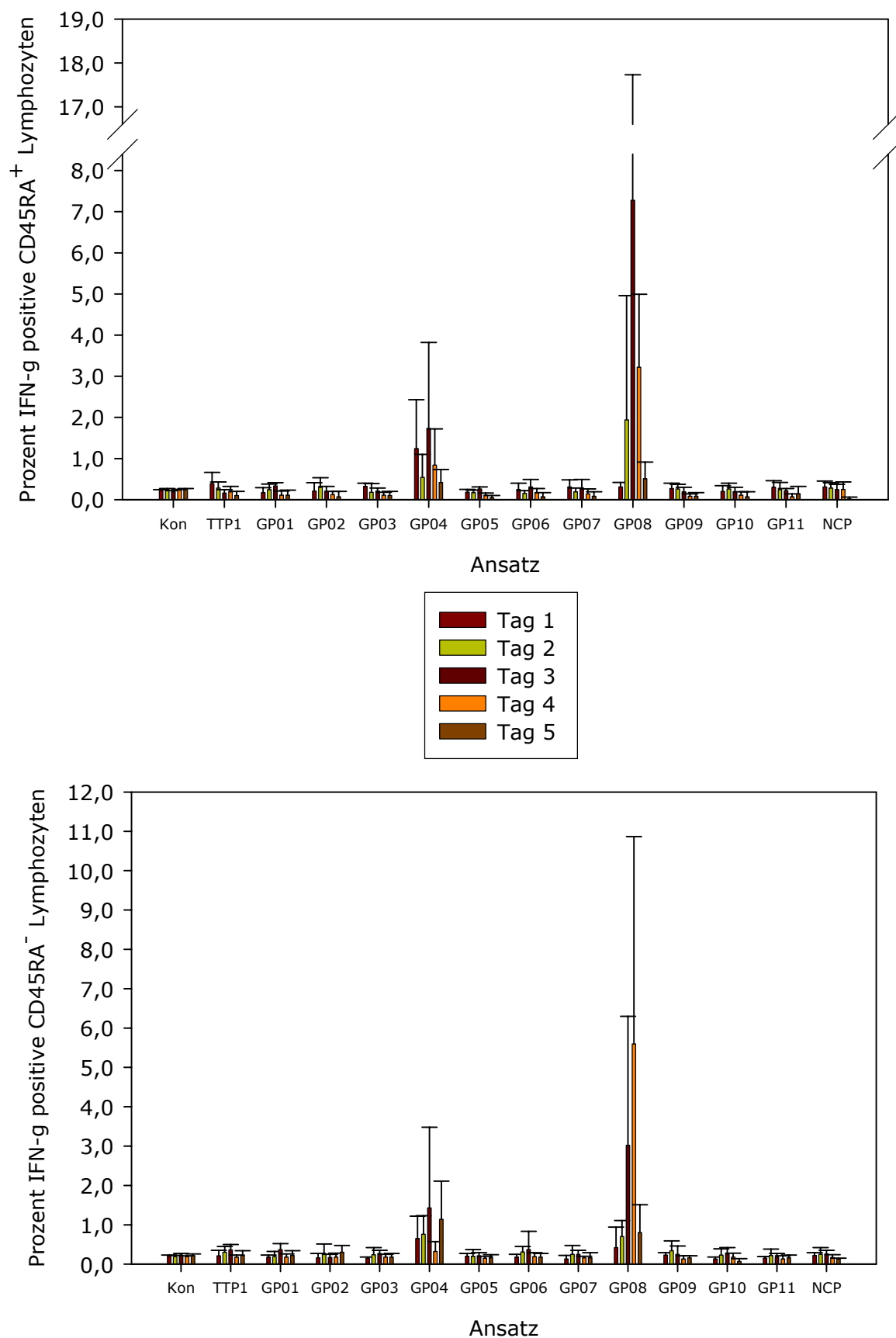


Abb. 3.24: Expression von IFN- γ in den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

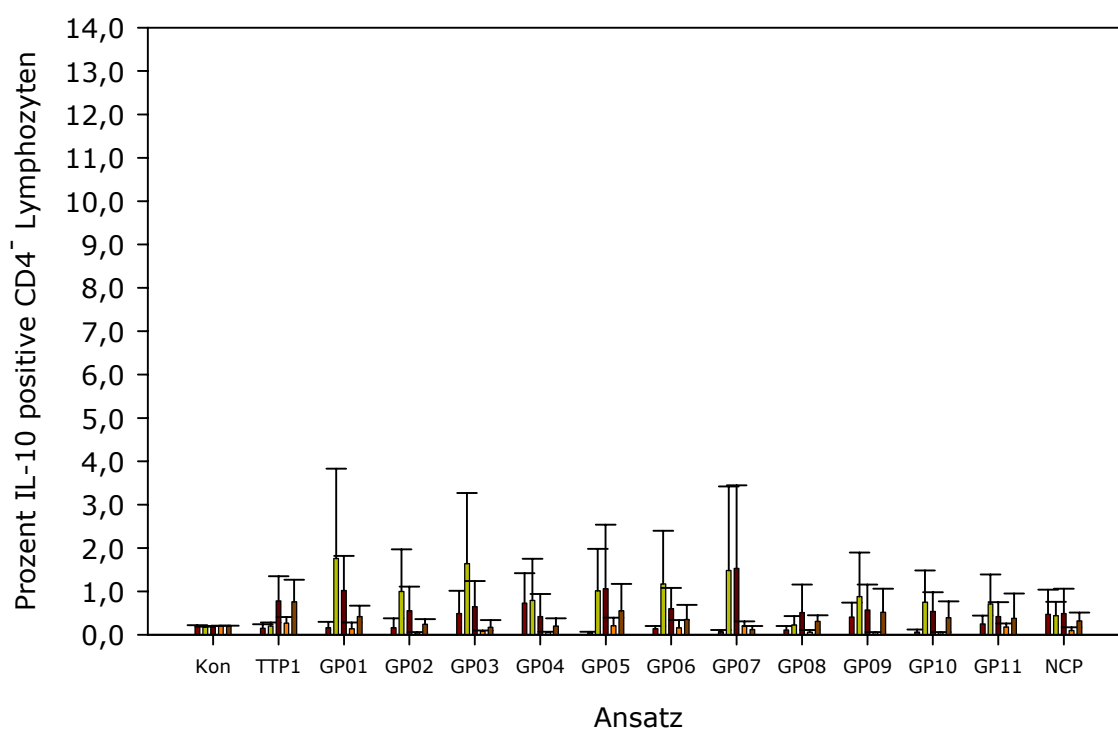
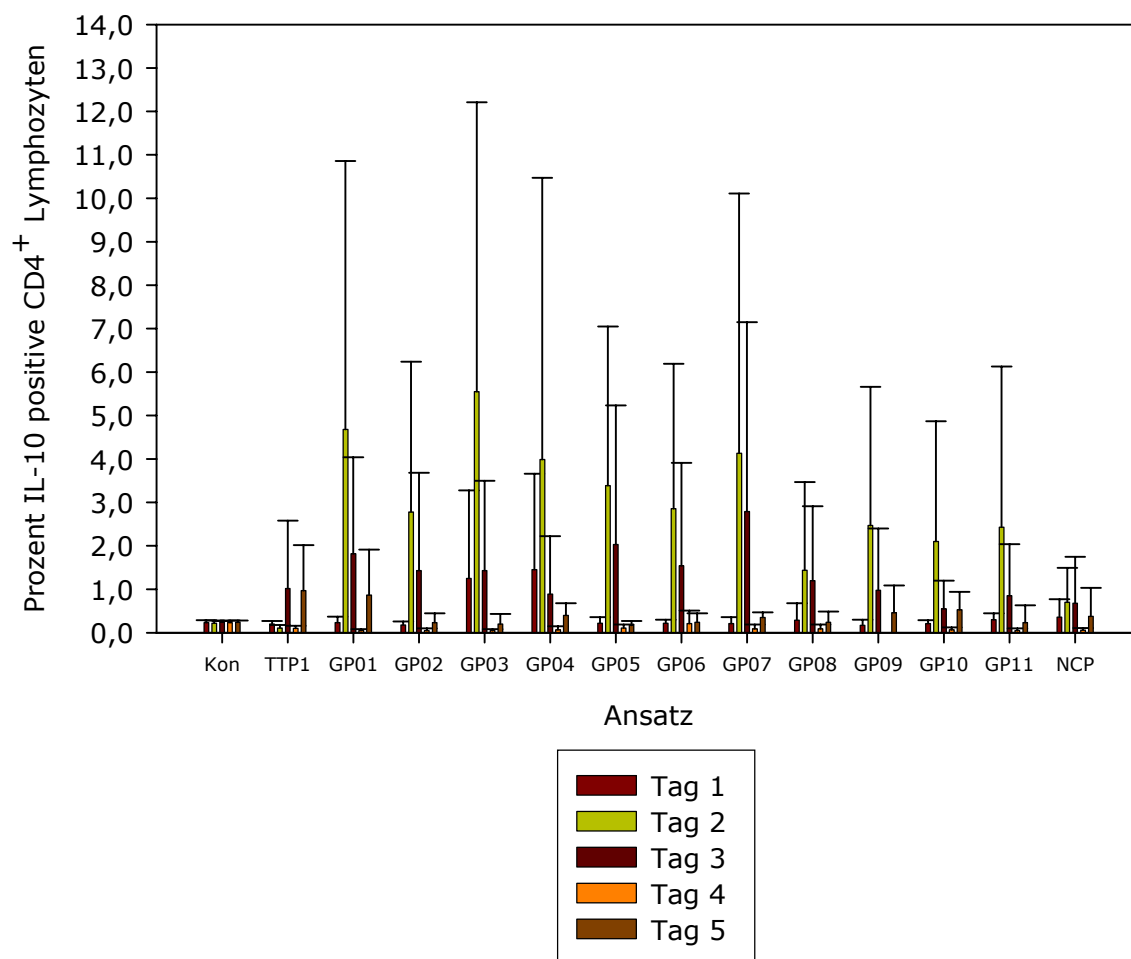


Abb. 3.25: Expression von IL-10 in den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

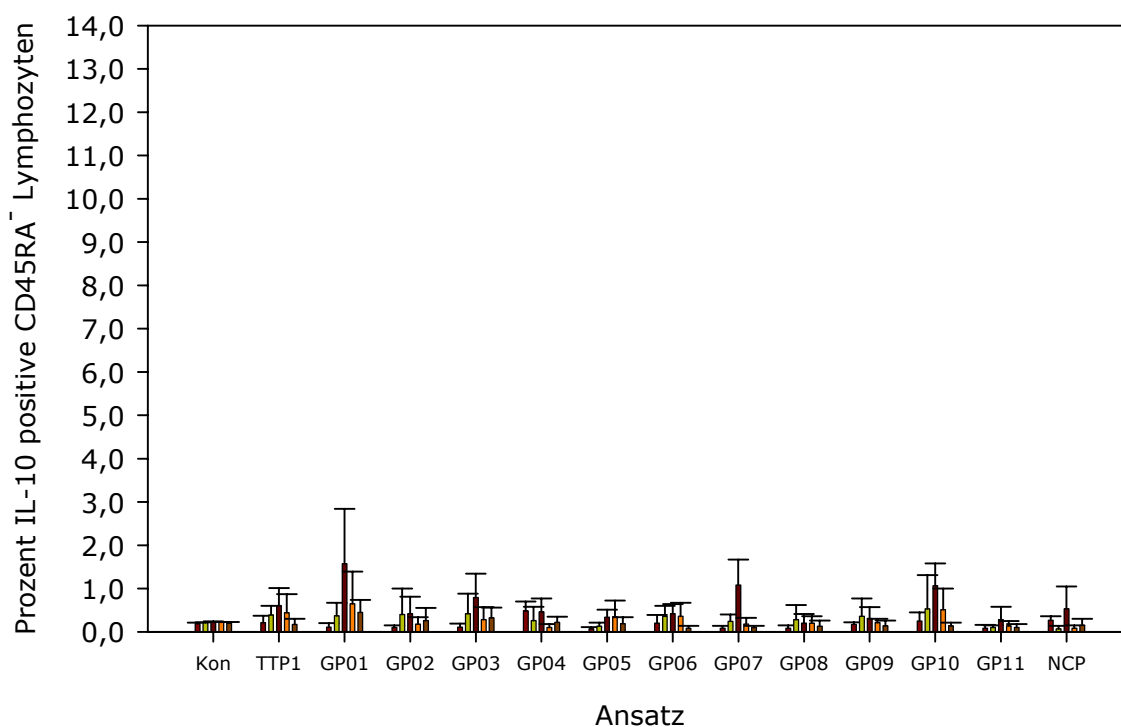
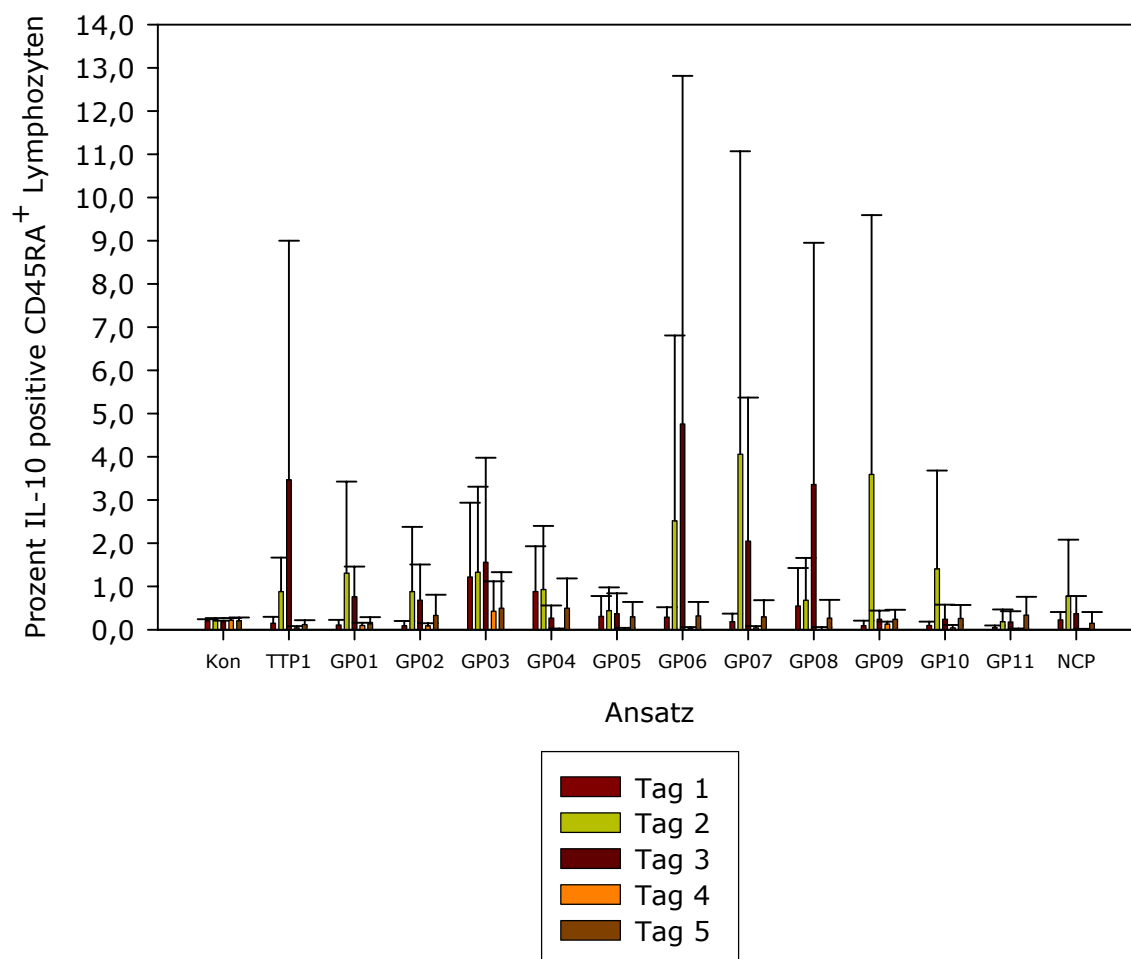


Abb. 3.26: Expression von IL-10 in den Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden im Zeitverlauf (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

3.3.2 Stimulation mit GAD-Peptiden für drei und vier Tage

Eine zweite Stimulationskinetik mit den GAD-Peptiden sollte durchgeführt werden, um deren Inkubationszeit eindeutig festzulegen. Die Blutproben weiterer vier Diabetes Typ I-Patienten sollten mit den gleichen GAD-Peptiden nur noch für drei oder vier Tage stimuliert und gemessen werden. Für die Abklärung einer spezifischen Stimulation im nachfolgenden Kapitel **3.3.3** sollte außerdem bei den Patienten eine serologische HLA-Typisierung durchgeführt werden. Die Wiederaufnahme der CD3-Färbung sollte gewährleisten, dass die detektierten Signale der Aktivierungsantigene ausschließlich von den T-Lymphozyten stammen.

Methodik: Das zur vorherigen Versuchsreihe identische Ansatzprotokoll wurde gemäß **2.2.1** durchgeführt und die Ansätze nach **2.2.2** und **2.2.5** gefärbt, gemessen und ausgewertet.

Ergebnisse: In den Abb. 3.27 bis 3.29 sind die Prozentanteile der antigenpositiven Memory und naiven T-Zellen nach drei und vier Tagen Stimulation gegenübergestellt. Die Ergebnisse der serologischen HLA-Patiententypisierung sind im nachfolgenden Kapitel in Tab. 3.7 aufgeführt.

Die Stimulation der T-Lymphozyten der Patienten war am besten mit dem Oberflächenmarker CD25 zu detektieren (siehe Abb. 3.27). Der Aktivierungsmarker wurde, wie in vorherigen Experimenten, auf beiden Subpopulationen hochreguliert. Die Positivkontrolle mit dem Peptid TTP1 ergab mit ca. 3 % der naiven und ca. 2 % der Memory T-Zellen die höchsten Mittelwerte. In den Ansätzen mit den Peptiden GP01 und GP05 konnten ebenfalls in beiden Gruppen mehr als 1 % CD25⁺ T-Zellen gemessen werden. Bei den Peptiden GP03, GP04, GP09, GP10 und GP11 konnten teilweise Mittelwerte über 0,5 % detektiert werden, wenngleich diese aufgrund ihrer hohen Standardabweichung als nicht zuverlässig erscheinen. Zwischen den Durchschnittswerten der drei und vier Tage inkubierten Ansätze waren kaum Unterschiede zu messen.

Andere Resultate stellen sich bei der CD134-Messung dar (siehe Abb. 3.28): Nur auf den CD45R0⁺ Memory T-Zellen konnten erhöhte Werte bestimmt werden. Eindeutig detektierbare Stimulationen begrenzten sich auf die Inkubationen mit TTP1 und GP01, die zu 0,6 – 1,1 % CD134⁺ T-Zellen führten. Tendenziell waren nach vier Tagen mehr positive T-Lymphozyten detektierbar. Alle übrigen Peptidinkubationen ergaben lediglich einen geringen Anstieg an antigenpositiven T-Zellen, die nicht als Stimulation gewertet wurden.

Die IFN- γ ⁺ T-Zellen zeigen ein eher uneinheitliches Bild (siehe Abb. 3.29): Besonders am Tag 4 wurden bei den naiven und den Memory T-Zellen erhöhte Durchschnittswerte (bis 1,4 %) für die Peptidinkubationen mit GP01, GP05, GP09 und NCP gemessen. Neben den großen Fehlerbalken lassen jedoch vor allem die erhöhten Mittelwerte des Peptids NCP (0,9 und 1,2 %) die Spezifität der Stimulation nach diesem längeren Zeitraum zweifelhaft erscheinen. Die Inkubation mit NCP als Negativkontrolle dürfte zu keiner Hochregulation führen. Für die nachfolgende vergleichende Stimulation der vier Kontrollpersonen kann das Protokoll nochmals vereinfacht werden. Eine Inkubationsdauer von 72 h ist ausreichend, um eine erfolgte Stimulation über die Expression von Aktivierungsantigenen an der Oberfläche von T-Zellen zu messen. Besonders der Anstieg der NCP-Werte nach vier Tagen deutet auf die bereits erwähnte Bystander-Aktivierung hin. Die intrazelluläre Detektion von IFN- γ ergibt auch bei diesen Inkubationen keine zuverlässigen Resultate. Auf eine weitere Verfolgung dieses Zytokins kann deshalb verzichtet werden.

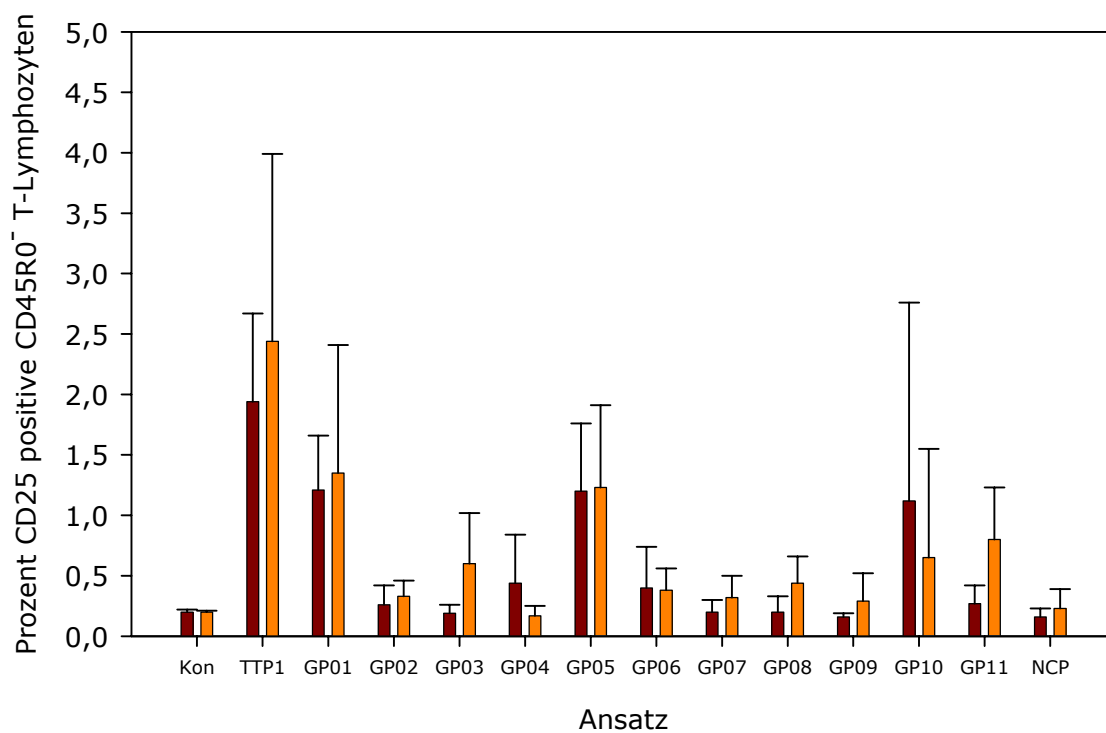
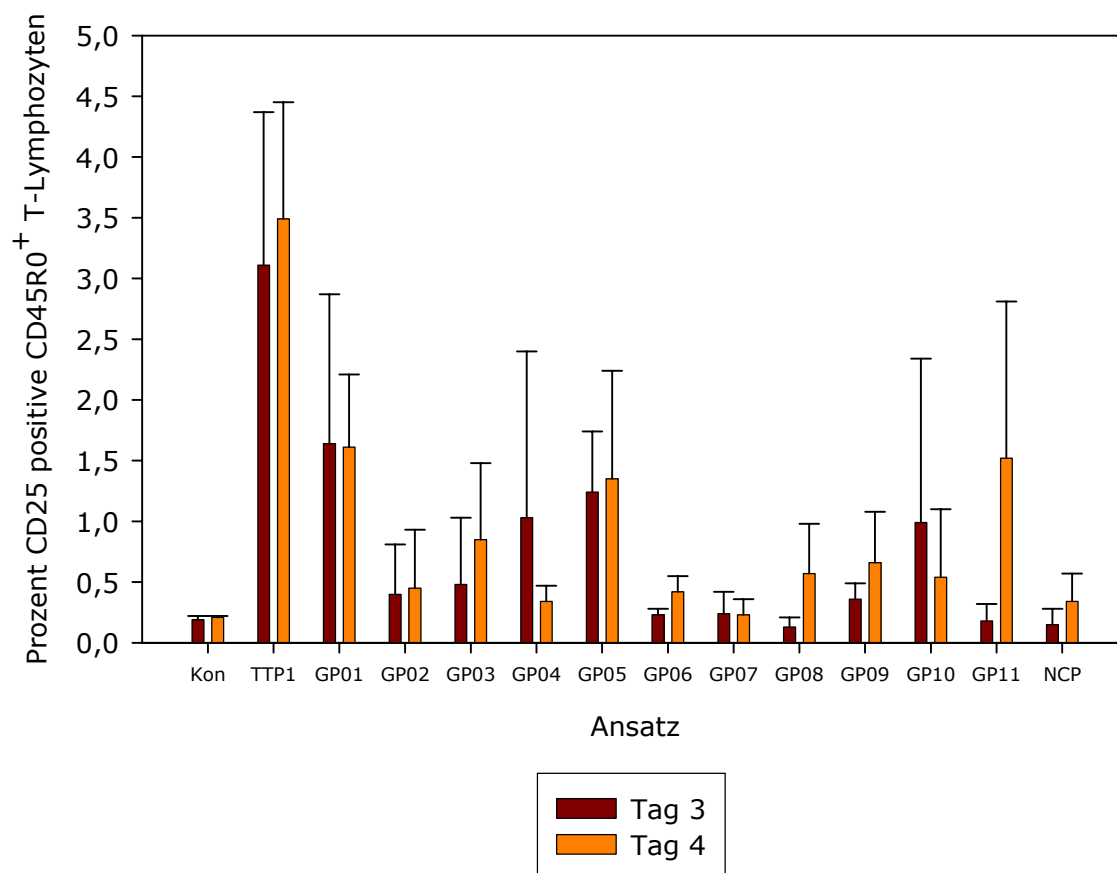


Abb. 3.27: Expression von CD25 auf T-Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden bei Diabetes Patienten (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

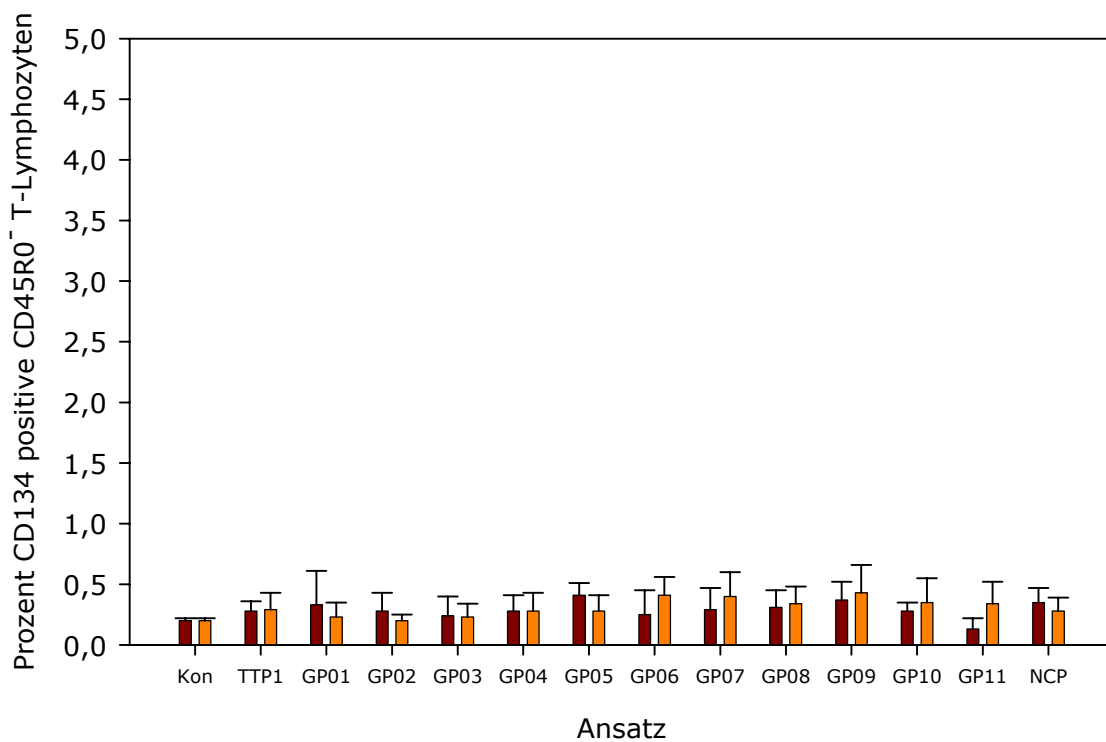
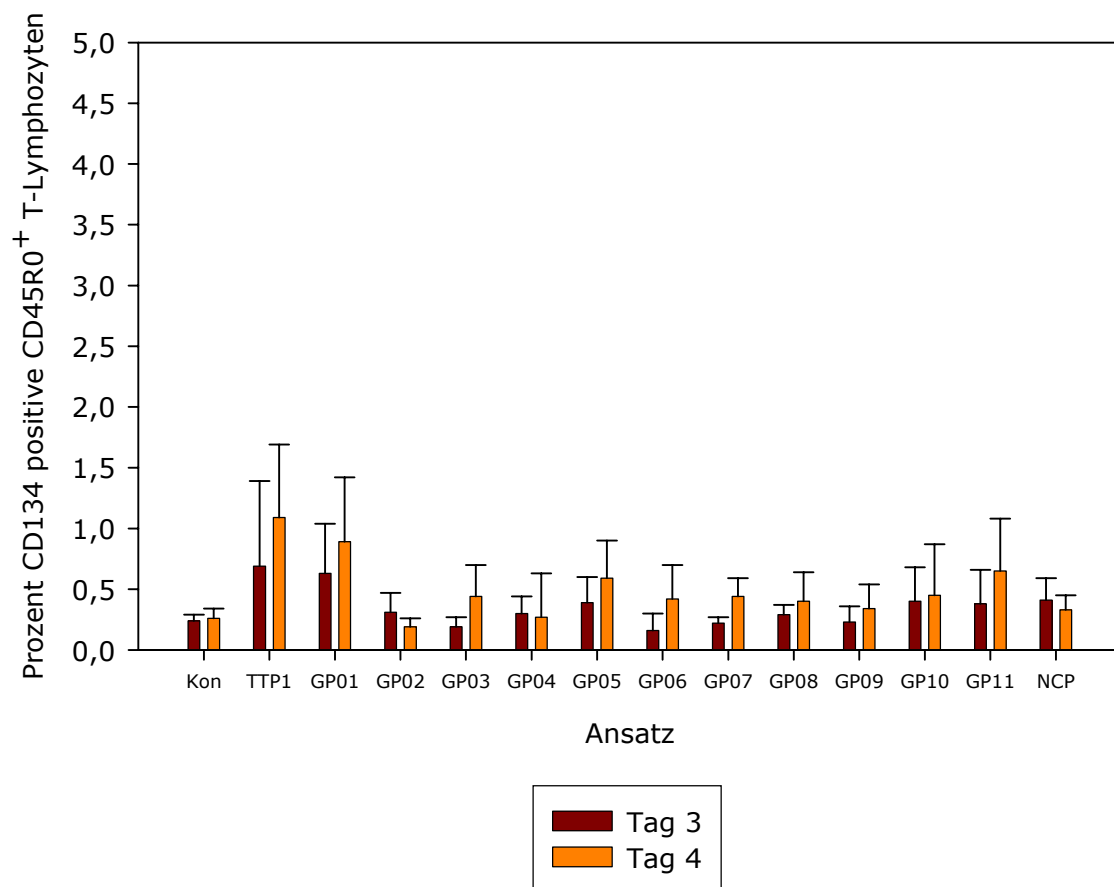


Abb. 3.28: Expression von CD134 auf T-Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden bei Diabetes Patienten (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

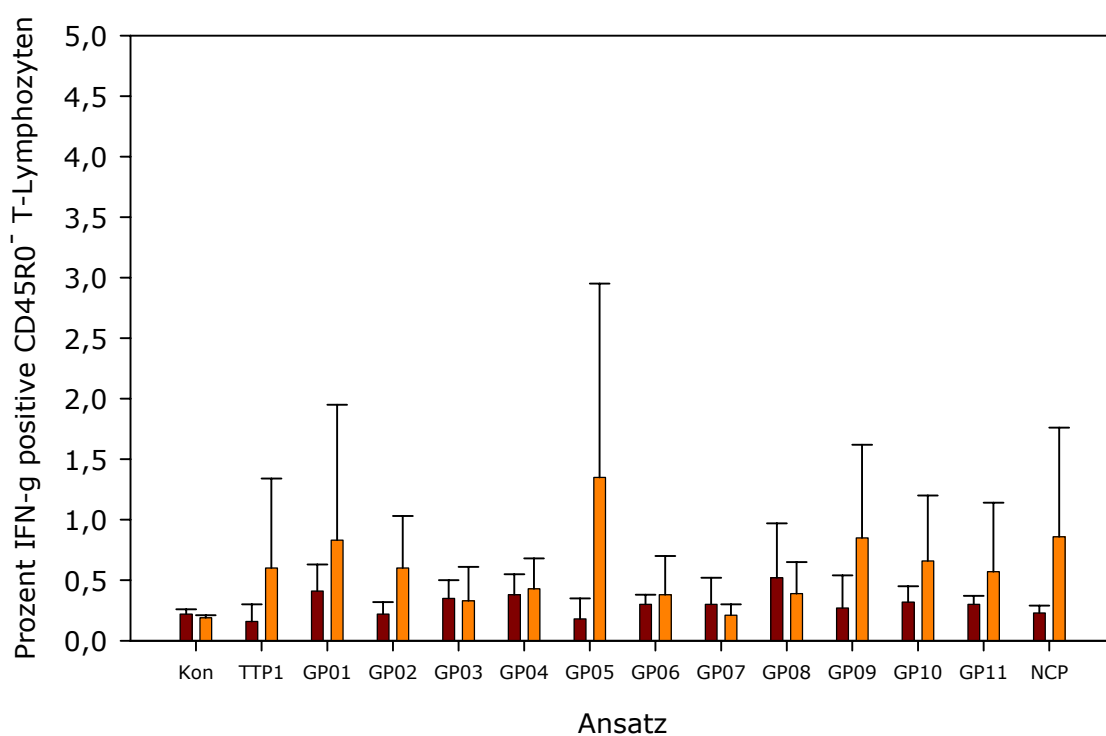
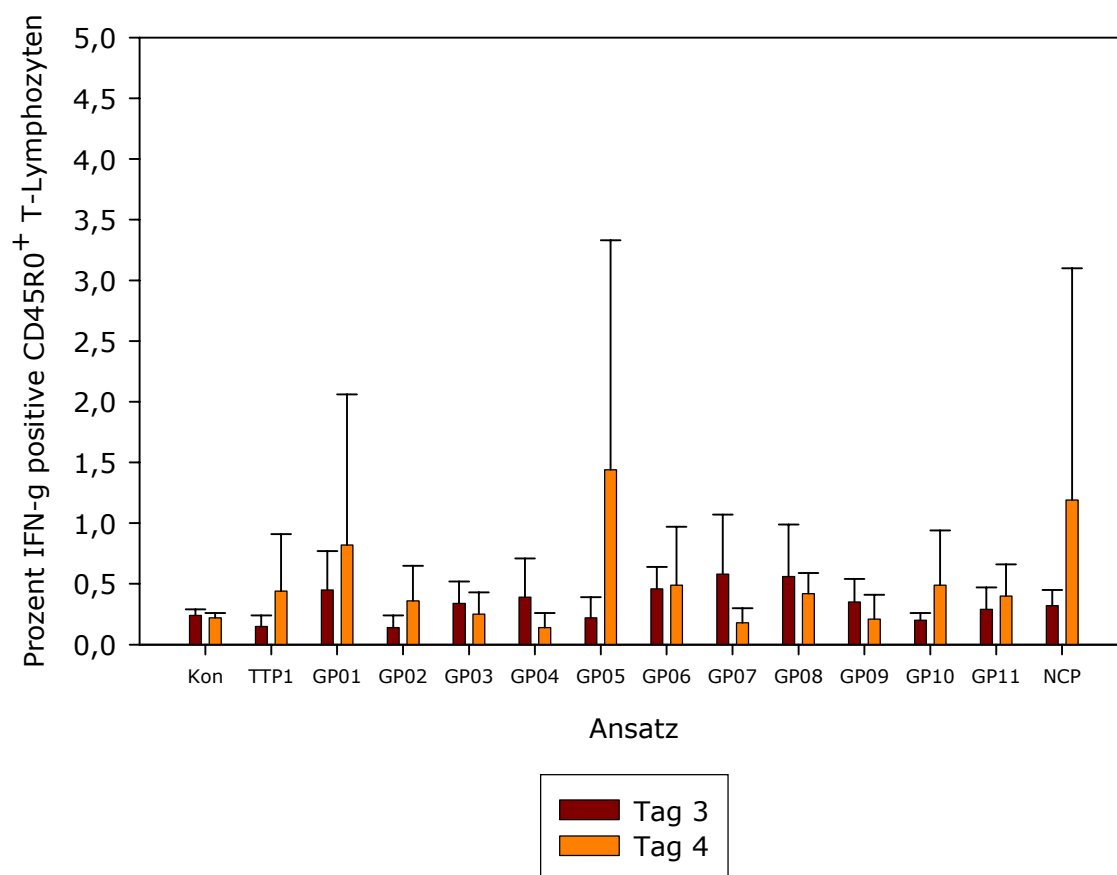


Abb. 3.29: Expression von IFN- γ in T-Lymphozyten nach Stimulation mit GAD-Peptiden bei Diabetes Patienten (n = 4, Kon: Lösungsmittelkontrolle)

3.3.3 Kontrolle der Spezifität der GAD-Peptidstimulation

Nach der Festlegung des optimalen Stimulationszeitraums und der Eingrenzung der zu messenden Aktivierungsantigene sollten in diesem Experiment gesunde Kontrollpersonen auf GAD-reaktive T-Lymphozyten untersucht werden. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass auch die PBLs von gesunden Probanden durch das GAD-Protein oder seine Peptide stimulierbar sind und darüber hinaus auf diesem Weg reaktive T-Zellklone gewonnen werden können [20; 94; 232]. Ein weiteres Ziel dieser Studie sollte sein, die Stimulierbarkeit von Blutproben der Patienten mit Diabetes Typ I aus **3.3.2** und der gesunden Probanden nach 72 h Inkubation mit den GAD-Peptiden zu vergleichen und eventuelle Unterschiede in den Antworten zu finden.

Die verwendeten Peptide GP01 bis GP11 haben eine hohe Bindungsaffinität an bestimmte HLA-Typen, die in der Tab. 3.6 mit den beiden Kontrollpeptiden aufgelistet sind [95; 160; 297; 369].

Bezeichnung	Affinität mit
TTP1	HLA-DR51, -DR52, -DR53
GP01	HLA-DR4
GP02	HLA-DR4
GP03	HLA-DR4, -DQ3
GP04	HLA-DR4, -DR53
GP05	HLA-DR4
GP06	HLA-DR3
GP07	HLA-DR4
GP08	HLA-DR4
GP09	HLA-DR3
GP10	HLA-DR53, -DQ3
GP11	HLA-DR4, -DR53
NCP	unbekannt

Tab. 3.6: Bindungsspezifität der eingesetzten Peptide

Der Abgleich der serologischen HLA-Typisierung mit den obigen Bindungsaffinitäten sollte die Spezifität der Stimulation von T-Lymphozyten in Vollblut mittels GAD-Peptide demonstrieren. Sollten sich bei den beiden Kollektiven

signifikante Unterschiede ergeben, könnte dies die Grundlage eines Bluttests für den Einsatz in der klinischen Routine darstellen.

Methodik: Die Inkubation der Proben, die Messung und Auswertung erfolgte wie in der vorherigen Versuchsreihe (siehe **2.2.1**, **2.2.2** und **2.2.5**)

Ergebnisse: Die für die Patienten (Pat.) ermittelten HLA-Typen sind in Tab. 3.7 und die für die gesunden Probanden (Kp.) erhaltenen Resultate in Tab. 3.8 aufgelistet. In den Tab. 3.9 und 3.10 wurden die einzelnen CD25-Prozentwerte aller acht untersuchten Blutproben dargestellt. Die für den Aktivierungsmarker CD134 gemessenen Einzelwerte sind in den Tab. 3.11 und 3.12 aufgeführt.

Abkürzung	HLA-Typ
Pat. 1	DR1, DR7; DR53; DQ3, DQ1
Pat. 2	DR4, DR8; DR52, DR53; DQ7 (3), DQ4
Pat. 3	DR3, DR4; DR52, DR53; DQ2, DQ3
Pat. 4	DR1, DR12; DR52; DQ1, DQ7 (3)

Tab. 3.7: Ergebnisse der serologischen HLA-Typisierung der Patienten

Abkürzung	HLA-Typ
Kp. 1	DR15 (2), DR13 (6); DR51, DR52; DQ1, DQ7 (3)
Kp. 2	DR1, DR3; DR52; DQ1, DQ2
Kp. 3	DR4, DR15 (2); DR51, DR53; DQ6 (1), DQ7 (3)
Kp. 4	DR3, DR15 (2); DR51, DR52; DQ1, DQ2

Tab. 3.8: Ergebnisse der serologischen HLA-Typisierung der Kontrollpersonen

Bei den Patienten zeigen nur zwei von vier Probanden das für Diabetes Typ I charakteristische Antigen DR4 (siehe Tab. 3.7). Ansonsten sind die beiden Gruppen bezüglich der untersuchten HLA-Typen gut gemischt.

Die Ergebnisse der HLA-Typisierung, der Bindungsspezifität der GAD-Peptide und der Antigenmessungen sind in den Tab. 3.9 bis 3.12 folgendermaßen verknüpft worden: Eine aufgrund des HLA-Typs und der Bindungsaffinität des Peptids mögliche Stimulation ist blau dargestellt. Konnte diese potenzielle Stimulation anhand der Hochregulation der Aktivierungsmarker gemessen werden, so sind diese Prozentwerte grün markiert. Die Grenze einer positiven Stimulation liegt für die naiven respektive Memory T-Zellen bei jeweils 0,8 % (aufgerundet) an CD25⁺ oder CD134⁺ Zellen. Erfolgte eine Stimulation obwohl die Affinität des Peptids nicht mit dem HLA-Typ kompatibel ist, so ist diese Hochregulation rot dargestellt.

Die Einzelwerte an CD25⁺ T-Zellen bezogen auf die eingesetzten Peptide stellen sich in den Tab. 3.9 und 3.10 für die beiden Subpopulationen (CD45R0^{+/-}) wie folgt dar: Während beim Peptid TTP1 größtenteils in beiden Subpopulationen eine Stimulation detektierbar war, führte die Zugabe von NCP zu keiner wesentlichen Erhöhung an CD25⁺ T-Zellen. Lediglich bei Kp. 1 konnte keine Stimulation nach der Inkubation mit TTP1 gemessen werden.

Anders verhielt es sich beim Peptid GP01: Aufgrund seiner Bindungsaffinität sollte es nur bei Pat. 2 und 3 und Kp. 3 eine Hochregulation induzieren. Jedoch konnten auch bei jeweils drei weiteren Personen eine Aktivierung der naiven und/oder der Memory T-Zellen detektiert werden, obwohl es aufgrund des HLA-Typs nicht zu erwarten war.

Die Peptide GP02, GP03 und GP04 führten hingegen mehrheitlich zu mit den HLA-Allelen übereinstimmenden und erfolgten Stimulationen. Während in zwei Fällen das GP02 nicht erwartete Antworten verursachte, konnten hingegen sechs zum HLA-Typ kompatible und erfolgte Hochregulationen detektiert werden. Wie bereits erwähnt hat GP02 einen Sequenzfehler, weshalb eine spezifische Stimulation angezweifelt werden muss. Mit GP03 und GP04 wurden vier erwartete und nur eine nicht erwartete Stimulation bei Kp. 4 gemessen.

Auch nach der Inkubation der Blutproben mit GP05 wurden bei drei Personen jeweils eine mit dem HLA-Allelen kompatible und nur bei Pat. 1 eine nicht kompatible Antwort in beiden Subpopulationen gemessen.

Bei den übrigen Peptiden GP06 bis GP11 konnten oft keine erwarteten Antworten gemessen werden. Aber auch mit diesen Stimuli wurden bei drei Probanden mehr Ansätze mit erwarteten (5) als mit nicht erwarteten (3) aktivierten CD25⁺ T-Zellen gemessen.

Die Tab. 3.11 und 3.12 zeigen für die CD134⁺ T-Zellen der beiden Subpopulationen nur in einzelnen Fällen eine Hochregulation nach der Inkubation mit den GAD-Peptiden trotz der identischen Anzahl potenzieller Stimulationen. Selbst die Positivkontrolle TTP1 erbrachte nur eine deutliche Hochregulation des CD134-Antigens bei Pat. 2. Die insgesamt sechs mit den HLA-Allelen übereinstimmenden und erfolgten Antworten wurden bei vier Personen hauptsächlich innerhalb der Memory T-Zellen detektiert, und sie wurden von einer nicht erwarteten Aktivierung bei Kp. 1 begleitet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass infolge der Inkubation mit den GAD-Peptiden deutlich mehr CD25⁺ als CD134⁺ T-Zellen gemessen werden können. Allerdings sind innerhalb der über CD25 detektierten Stimulationen auch einige nicht HLA-kompatible Antworten (vor allem bei Pat. 1 und Kp. 4), die mit der CD134-Messung nicht erhalten werden. Dabei verteilen sich diese unerwarteten Stimulationen bei den gesunden Kontrollpersonen hauptsächlich unter den CD25⁺/CD45R0⁺ T-Zellen, während die Patienten diese Ergebnisse innerhalb der CD45R0⁻ T-Zellen zeigen. In beiden T-Zellsubpopulation und in beiden Gruppen überwiegt jedoch die Zahl der HLA-kompatiblen aber nicht erfolgten Stimulationen.

Zwischen den Kontrollpersonen und den Diabetes Typ I-Patienten sind mit diesem Stimulationsansatz generell keine signifikanten Unterschiede in den Antworten festzustellen. Weder die Höhe der Antigenexpression noch die Anzahl der erwarteten und erfolgten Stimulationen zeigen erkennbare Differenzen. Die Ungleichverteilung der unerwartet aktivierten CD25⁺ T-Zellen ist zwar auffällig, aber für die Aufgabenstellung eines angestrebten Bluttest unerheblich. Somit konnte die Zielsetzung eines einfachen Vollblutansatzes zur Abschätzung einer GAD-spezifischen Immunantwort als mögliches Diabetesrisikos mittels DFZ nicht erreicht werden.

Peptid	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Kp. 1	Kp. 2	Kp. 3	Kp. 4
-	0,20	0,20	0,23	0,21	0,21	0,23	0,21	0,24
TTP1	2,85	5,23	2,21	1,37	0,23	1,62	4,88	2,05
GP01	0,48	3,67	1,52	0,48	2,01	2,48	2,58	1,71
GP02	0,00	0,14	0,38	0,50	0,99	0,00	3,21	0,49
GP03	0,00	0,27	0,22	0,12	0,04	0,09	0,52	0,30
GP04	0,32	0,00	3,39	0,34	0,22	0,28	1,20	1,75
GP05	1,08	1,98	1,31	0,46	0,14	0,11	0,79	0,63
GP06	0,16	0,21	0,29	0,09	0,06	0,62	0,45	1,18
GP07	0,00	0,28	0,19	0,36	0,32	0,11	0,51	0,50
GP08	0,00	0,19	0,14	0,42	0,19	0,09	1,19	0,86
GP09	0,26	0,42	0,23	0,14	0,02	0,16	0,45	0,58
GP10	3,33	0,15	0,10	0,40	0,19	0,32	0,75	1,14
GP11	0,00	0,33	0,10	0,40	0,23	0,16	0,27	0,16
NCP	0,00	0,35	0,12	0,21	0,04	0,04	0,50	0,29

Tab. 3.9: Durchschnittliche Prozentwerte der CD25⁺/CD45R0⁺ Memory T-Lymphozyten bei Patienten und Kontrollpersonen

Peptid	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Kp. 1	Kp. 2	Kp. 3	Kp. 4
-	0,21	0,21	0,17	0,13	0,22	0,24	0,21	0,22
TTP1	3,05	2,13	1,21	2,14	0,23	0,84	1,63	0,67
GP01	1,28	1,36	1,71	0,89	0,65	1,02	0,97	0,67
GP02	0,15	0,08	0,31	1,07	0,49	0,10	0,78	0,15
GP03	0,30	0,13	0,19	1,42	0,21	0,19	0,09	0,14
GP04	0,31	0,03	1,10	0,43	0,25	0,22	0,22	0,31
GP05	1,95	1,44	0,94	0,59	0,16	0,20	0,08	0,33
GP06	0,96	0,18	0,35	0,27	0,08	0,22	0,18	0,17
GP07	0,11	0,15	0,18	0,49	0,27	0,08	0,10	0,13
GP08	0,16	0,17	0,06	0,20	0,14	0,18	0,15	0,13
GP09	0,12	0,21	0,17	0,54	0,18	0,28	0,10	0,16
GP10	3,95	0,08	0,07	0,40	0,13	0,21	0,20	0,23
GP11	0,43	0,19	0,07	0,30	0,10	0,18	0,12	0,10
NCP	0,10	0,08	0,23	0,13	0,10	0,08	0,06	0,06

Tab. 3.10: Durchschnittliche Prozentwerte der CD25⁺/CD45R0⁻ naiven T-Lymphozyten bei Patienten und Kontrollpersonen

Peptid	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Kp. 1	Kp. 2	Kp. 3	Kp. 4
-	0,32	0,18	0,22	0,23	0,21	0,21	0,22	0,20
TTP1	0,53	1,87	0,22	0,14	0,36	0,35	0,39	0,17
GP01	0,28	1,33	0,53	0,39	0,83	0,58	1,14	0,12
GP02	0,56	0,11	0,31	0,27	0,41	0,40	0,45	0,12
GP03	0,14	0,10	0,30	0,22	0,10	0,63	0,37	0,38
GP04	0,41	0,13	0,46	0,22	0,41	0,68	0,37	0,23
GP05	0,40	0,67	0,39	0,09	0,21	0,14	0,32	0,04
GP06	0,15	0,06	0,39	0,04	0,17	0,48	0,23	0,32
GP07	0,25	0,17	0,29	0,16	0,58	0,31	0,25	0,13
GP08	0,26	0,42	0,29	0,21	0,44	0,40	0,18	0,18
GP09	0,27	0,13	0,09	0,42	0,20	0,45	0,42	0,29
GP10	0,87	0,24	0,33	0,17	0,25	0,45	0,34	0,10
GP11	0,79	0,12	0,47	0,13	0,21	0,49	0,40	0,16
NCP	0,62	0,47	0,43	0,12	0,08	0,49	0,50	0,25

Tab. 3.11: Durchschnittliche Prozentwerte der CD134⁺/CD45R0⁺ Memory T-Lymphozyten bei Patienten und Kontrollpersonen

Peptid	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Kp. 1	Kp. 2	Kp. 3	Kp. 4
-	0,22	0,17	0,19	0,21	0,16	0,20	0,19	0,20
TTP1	0,22	0,34	0,19	0,37	0,21	0,10	0,39	0,17
GP01	0,00	0,34	0,76	0,22	0,33	0,13	0,37	0,13
GP02	0,18	0,30	0,53	0,13	0,29	0,20	0,30	0,25
GP03	0,22	0,20	0,48	0,05	0,22	0,37	0,44	0,23
GP04	0,11	0,37	0,44	0,21	0,40	0,22	0,54	0,12
GP05	0,51	0,35	0,50	0,29	0,14	0,17	0,28	0,15
GP06	0,05	0,14	0,59	0,21	0,10	0,11	0,31	0,04
GP07	0,00	0,50	0,34	0,33	0,32	0,27	0,09	0,07
GP08	0,11	0,49	0,33	0,30	0,22	0,18	0,28	0,07
GP09	0,11	0,41	0,47	0,48	0,13	0,29	0,37	0,11
GP10	0,17	0,34	0,30	0,31	0,17	0,21	0,39	0,06
GP11	0,17	0,23	0,00	0,13	0,13	0,47	0,47	0,08
NCP	0,17	0,50	0,36	0,37	0,17	0,38	0,33	0,13

Tab. 3.12: Durchschnittliche Prozentwerte der CD134⁺/CD45R0⁻ naiven T-Lymphozyten bei Patienten und Kontrollpersonen

3.4 Untersuchungen zur Apoptose bei Autoimmunpatienten

Nach der Charakterisierung von autoantigenspezifischen T-Zellen im Kontext von Autoimmunerkrankungen sollte in diesem Teil ein anderer experimenteller Zugang verwendet werden. Dazu sollte für separierte PBLs ein Apoptose-induktionsansatz etabliert werden, der es ermöglicht in T-Zellen den programmierten Zelltod auszulösen. Diese untergehenden T-Zellen der verschiedenen Probanden sollten mittels Durchflusszytometrie detektiert und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollten auf diese Weise Differenzen zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit diversen Erkrankungen des Immunsystems entdeckt werden. Die bisherigen Erkenntnisse dazu wurden in **1.1** dargestellt.

In einem ersten Vergleich sollten an gesunden Probanden verschiedene Reagenzien getestet werden, um *in vitro* die Induzierbarkeit der Apoptose in T-Zellen zu charakterisieren.

Danach sollten diese T-Zellen auf verschiedene Oberflächenantigene und die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 untersucht werden. Außerdem sollten neben den T-Zellen von Kontrollpersonen auch die der Patienten charakterisiert und miteinander verglichen werden.

Mit der Eingrenzung auf ein Reagenz und einem Inkubationszeitraum sollten mehr Versuche zur Charakterisierung der T-Zellen erfolgen. Die Untersuchung von Blutproben nicht anbehandelter Patienten sollte einen möglichen Einfluss der Therapie auf die Ergebnisse ausschliessen.

Schließlich sollte über die Induktion der Apoptose mittels CD95-Antikörper erprobt werden, ob dieser spezifische Ansatz mehr Unterschiede zwischen den Patienten und den gesunden Probanden erbringen kann.

3.4.1 Erprobung von fünf verschiedenen Apoptosestimuli

Das Ziel dieses Vorversuchs sollte sein, an gesunden Probanden fünf verschiedene Reagenzien auf ihre Fähigkeit auszutesten, die Apoptose in T-Zellen zu induzieren. Als Grundlage dienten diverse Veröffentlichungen, in denen in relativ kurzen Zeiträumen eine detektierbare Anzahl apoptotischer Leukozyten gemessen worden sind. Die Wirkungen der einzelnen Reagenzien, soweit sie bekannt sind, sind in den aufgeführten Publikationen erläutert [28; 120; 162; 264]. Die Messung der apoptotischen T-Zellen sollte nur mit Annexin V und PI erfolgen, da der Schwerpunkt auf die Erprobung der verschiedenen Reagenzien liegen sollte (siehe 1.4.5).

Methodik: Die Durchführung der Versuche, der Färbungen und der Messungen sind in 2.2.3, die nachfolgende Identifizierung der apoptotischen T-Zellen ist in 2.2.5 beschrieben.

Ergebnisse: Die Abb. 3.30 zeigt die Anzahl Annexin V⁺ T-Zellen nach der Inkubation der Ansätze mit den fünf Stimuli. Nur zwei der fünf Reagenzien bewirken deutliche und zumeist stabile Signale.

In den Ansätzen mit dem Lösungsmittel DMSO wurde nur ein geringer Anstieg der Annexin V⁺ T-Zellen von 0,1 % bei sofortiger Messung auf 1,4 % nach drei Tagen Inkubation gemessen.

Ähnliche Mittelwerte konnten infolge der Inkubation der PBLs mit 2-Chloradensin, Staurosporin oder mit einer Kombination aus PMA/Ionomycin und Methotrexat gemessen werden. Die errechneten Durchschnittswerte bewegten sich innerhalb der drei Tage zwischen 0,3 und knapp 2 % apoptotischer T-Zellen. Dieser detektierbare Anteil lag im Bereich der Kontrollansätze mit DMSO, weshalb hier von keiner messbaren Induktion des programmierten Zelltods ausgegangen werden kann.

Ganz andere Ergebnisse erzielten die Inkubationen mit 2-Chloro-2'-deoxy-adenosin. Bereits nach einem Tag konnten im Ansatz durchschnittlich 5,5 % Annexin V⁺ T-Zellen gemessen werden, deren Anteil nach zwei Tagen auf 25 und nach drei Tagen auf 21 % anstieg. Dabei waren jedoch nach drei Tagen insgesamt nur noch wenige T-Zellen detektierbar, was die höhere Standardabweichung verursachte.

Die Messungen der Ansätze mit 2-Deoxy-D-ribose ergaben erst nach zwei Tagen eine deutliche Population von 32 % Annexin V⁺ T-Zellen gegenüber dem Mittelwert von ca. 1 % nach einem Tag Inkubation. Auch mit diesem Stimulus konnten

nach drei Tagen weniger apoptotische T-Zellen (20,5 %) gemessen werden, verbunden mit einer geringeren Gesamtzahl aller detektierbaren T-Zellen.

Die parallel durchgeführte Färbung nekrotischer Zellen mit PI ergab nur in einigen Messungen wenige positive T-Lymphozyten.

Allgemein kann zusammengefasst werden, dass die Inkubation über einen Zeitraum von zwei Tagen ausreicht, um in den Ansätzen zuverlässig apoptotische T-Lymphozyten nachweisen zu können. Die beiden Stimuli 2-Chloro-2'-deoxyadenosin und 2-Deoxy-D-ribose sind für die Induktion der Apoptose gut geeignet, während die übrigen Reagenzien nur geringe Wirkungen zeigen.

In den nachfolgenden Versuchsreihen sollten die hier erhaltenen Ergebnisse an den Blutproben von Patienten mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten und gesunden Kontrollpersonen ausgetestet werden. Neben der Identifikation der apoptotischen T-Zellen sollte auch eine weitergehende und vergleichende Charakterisierung erfolgen.

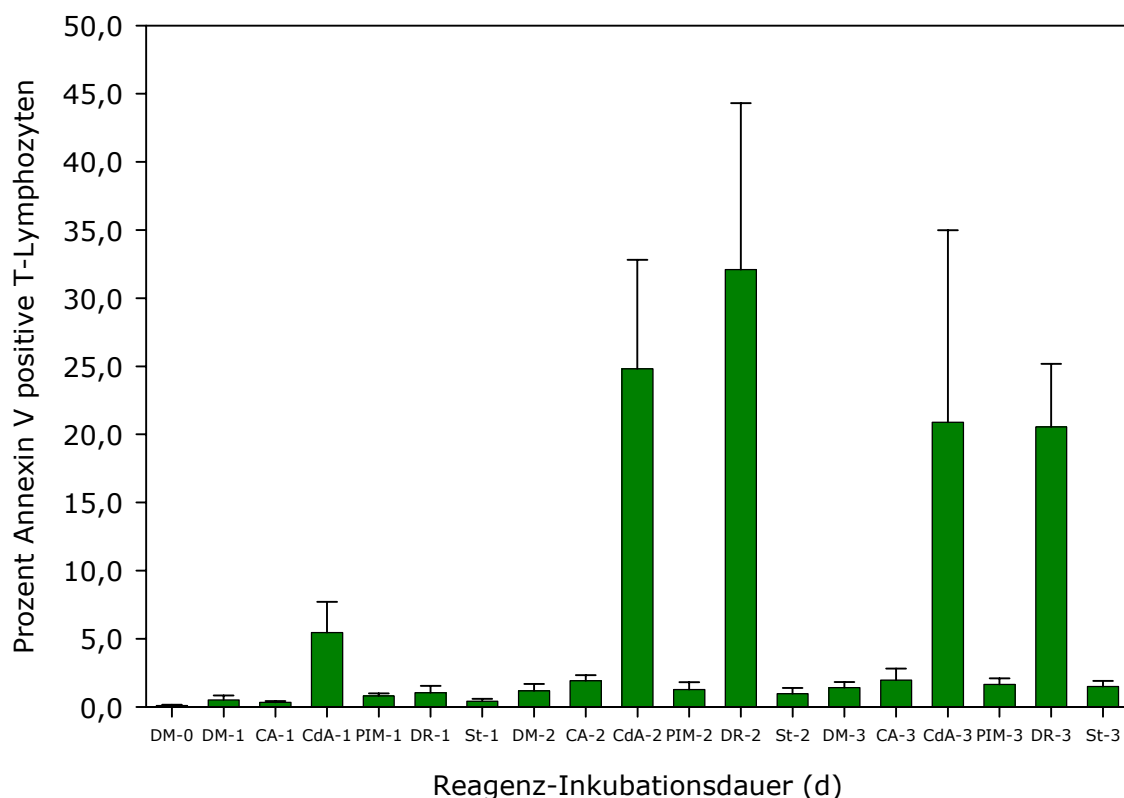


Abb. 3.30: Annexin V-Signal auf T-Zellen von Kontrollprobanden nach Induktion der Apoptose (n = 4, CA: 2-Chloradenosin, CdA: 2-Chloro-2'-deoxyadenosin, DM: DMSO, DR: 2-Deoxy-D-ribose, PIM: PMA/Ionomycin/Methotrexat, St: Staurosporin)

3.4.2 Vergleich von drei Apoptoseinduktoren an T-Zellen von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen

Als Konsequenz aus den gewonnenen Erkenntnissen der vorhergehenden Versuchsreihe sollten nur noch drei Stimuli verwendet werden. Außer 2-Chloro-2'-deoxyadenosin und 2-Deoxy-D-ribose sollte nochmals Staurosporin an sieben Kontrollpersonen und fünf Patienten mit SLE (3), Sjögren's Syndrom (1) und APS (1) ausgetestet werden (siehe **1.1** und **1.4**). Die Identifizierung apoptotischer T-Zellen anhand ihrer Exposition von PS an der Zelloberfläche sollte durch die Messung verschiedener extrazellulärer Ceramide und der Detektion des intrazellulären Bcl-2 ergänzt werden. Auf diese Weise sollte eine detailliertere Charakterisierung der sterbenden T-Lymphozyten erfolgen und eventuelle Unterschiede zwischen den Probanden ermittelt werden.

Methodik: Die Ansätze und die Färbungen wurden gemäß **2.2.3** angepasst. Die Messungen wurden nach **2.2.5** ausgewertet.

Ergebnisse: In den Abb. 3.31 bis 3.33 wurden die Ergebnisse aller Probanden und Reagenzien nach einem und zwei Tagen Inkubation dargestellt. Während für Annexin V und Bcl-2 teilweise sehr hohe Mittelwerte zu sehen sind, zeigen die gemessenen Ceramide nur geringe Signale.

Die Messung der PS-Exposition an der Oberfläche der T-Zellen über Annexin V erbrachte in den DMSO-Ansätzen eine Steigerung innerhalb der zwei Tage von 0,2 bis 5,2 % (siehe Abb. 3.31). Dabei waren die Mittelwerte der Patienten leicht höher als die der Kontrollpersonen. Die Zugabe von Staurosporin bei allen Probanden ergab mit Durchschnittswerten von 0,3 bis 3,1 % keine Steigerung im Anteil Annexin V⁺ T-Zellen.

Dagegen führte die Inkubation mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin bereits nach einem Tag zu Durchschnittswerten von 9,8 % Annexin V⁺ T-Zellen bei den Kontrollpersonen und ca. 6 % bei den Patienten. Nach zwei Tagen konnten bei den gesunden und den SLE-Probanden Mittelwerte von 38,5 bzw. 25 % gemessen werden. Die Einzelwerte vom APS- und Sjögren-Patient waren mit 22 und 14 % noch unter dem Durchschnittswert der SLE-Patienten. Offensichtlich führt die Inkubation mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin bei den T-Zellen der gesunden Kontrollen zu einer höheren extrazellulären Exposition von PS als bei den T-Zellen der Patienten.

Eine andere Tendenz konnte in den Ansätzen mit 2-Deoxy-D-ribose festgestellt werden. Bereits nach einem Tag Inkubation wurden bei den gesunden Probanden

mit durchschnittlich 3,7 % weniger Annexin V⁺ T-Zellen gemessen als bei den SLE-Patienten mit 6,5 % Anteil. Diese Differenz erhöhte sich nach zwei Tagen Inkubation auf einen Mittelwert von 27 % bei den Kontrollpersonen und 41 % bei den SLE-Patienten. Mit einem Prozentwert von 50 konnte der höchste Anteil an Annexin V⁺ T-Zellen beim Sjögren-Patient bestimmt werden (APS-Patient: ca. 31 %). Die 2-Deoxy-D-ribose induziert offenbar in den T-Zellen der Patienten die Apoptose wirkungsvoller als in denen der gesunden Kontrollen.

Die intrazelluläre Färbung von Bcl-2 (siehe Abb. 3.31) ergab bereits in der sofortigen Messung relativ hohe Werte für alle Probanden (9 –13 % der T-Zellen) außer dem APS-Patienten (1,2 %). Die Inkubation der Ansätze mit DMSO alleine erhöhte bereits die Mittelwerte an Bcl-2⁺ T-Zellen erheblich. Nach einem Tag konnten bei den gesunden Probanden ein Anteil von 37 % und bei den SLE-Patienten von 63 % bestimmt werden. Diese Durchschnittswerte verringerten sich leicht nach einem weiteren Tag auf 25 % und 62 %. Einen ähnlichen Verlauf konnte auch für den Sjögren-Patienten gemessen werden (39 und 55 %), während der APS-Patient niedrigere Werte hatte (12 und 43 %).

Im Vergleich mit DMSO konnten in den Staurosporin-Ansätzen weniger T-Zellen gemessen werden, die Bcl-2 exprimierten. Die Zugabe verursachte bei allen Probanden einen Anteil von 8 bis 24 % an Bcl-2⁺ T-Zellen nach einem Tag und von 8 bis 47 % nach zwei Tagen.

Bei den übrigen Reagenzien 2-Chloro-2'-deoxyadenosin und 2-Deoxy-D-ribose ergaben die Messungen nach einem Tag Inkubation deutliche Unterschiede zum Lösungsmittel DMSO, aber nur geringe Differenzen innerhalb der beiden Stimuli (Kontrollen und APS: ca. 50%, SLE und Sjögren: ca. 80 % Anteil Bcl-2 exprimierender T-Zellen).

Nach zwei Tagen Inkubation konnten in den Ansätzen mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin bei den meisten Probanden ein Absinken der Bcl-2⁺ T-Zellen auf einen Anteil von ca. 50 % detektiert werden. Nur der Mittelwert der SLE-Patienten war mit ca. 62 % größer. Weiterhin waren zwischen den Ansätzen mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin und DMSO bei allen Probanden bis auf die Kontrollpersonen nur geringe Unterschiede zu messen.

Ein anderes Bild ergaben die Messung von Bcl-2 in den T-Zellen der Probanden nach zweitägiger Inkubation mit 2-Deoxy-D-ribose: Außer beim Sjögren-Patienten (Anteil: 33 %) waren in allen übrigen Ansätzen mit diesem Stimulus 86 bis 98 % der T-Zellen positiv für Bcl-2. Damit verursacht dieses Reagenz nach

zwei Tagen in fast allen T-Zellen eine deutliche Hochregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-2.

Ganz im Gegensatz zu den Messungen von Annexin V und Bcl-2 ergab die Detektion der Oberflächenceramide CDw17, CD65s, CD77 und Ceramid nur geringe Prozentwerte (siehe Abb. 3.32 und 3.33). Der Anteil der jeweiligen positiven T-Zellen wurde in der Regel mit weniger als 1 % unabhängig der zugegebenen Reagenzien bestimmt. Es kann daher angenommen werden, dass die Induktion der Apoptose mit den erprobten Reagenzien zu keiner höheren Exposition dieser Ceramide auf der Oberfläche der T-Zellen führt.

Als Fazit kann gezogen werden, dass die Inkubation von PBLs mit 2-Deoxy-D-ribose oder 2-Chloro-2'-deoxyadenosin zur Induktion der Apoptose in den T-Zellen geeignet ist. Das Staurosporin dagegen führt in der verwendeten Konzentration zu keinem erhöhten Anteil apoptotischer T-Zellen. Die Bestimmung der Oberflächenceramide in Kombination mit den verwendeten Reagenzien erbringt ebenfalls keine messbaren Signale. Eine Inkubation mit 2-Chloro-2'-deoxyadenosin über zwei Tage führt auch zu einer stark verminderten Anzahl an T-Zellen, weshalb sich für diesen Zeitraum die 2-Deoxy-D-ribose besser eignet.

In der nachfolgenden Patientenstudie sollten daher die Ansätze nur noch mit 2-Deoxy-D-ribose und der Lösungsmittelkontrolle für zwei Tage inkubiert werden. Auf die Detektion der Ceramide konnte vorerst verzichtet werden; trotzdem sollte weiterhin versucht werden, die apoptotischen T-Zellen mit anderen Methoden zu charakterisieren.

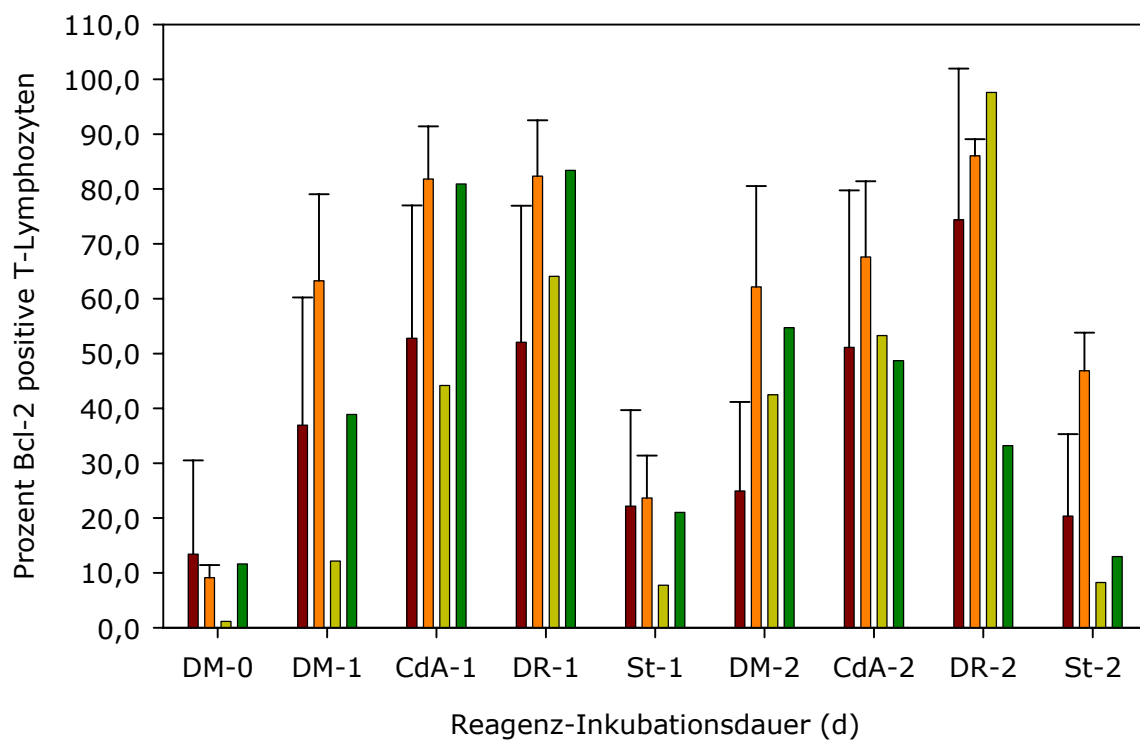
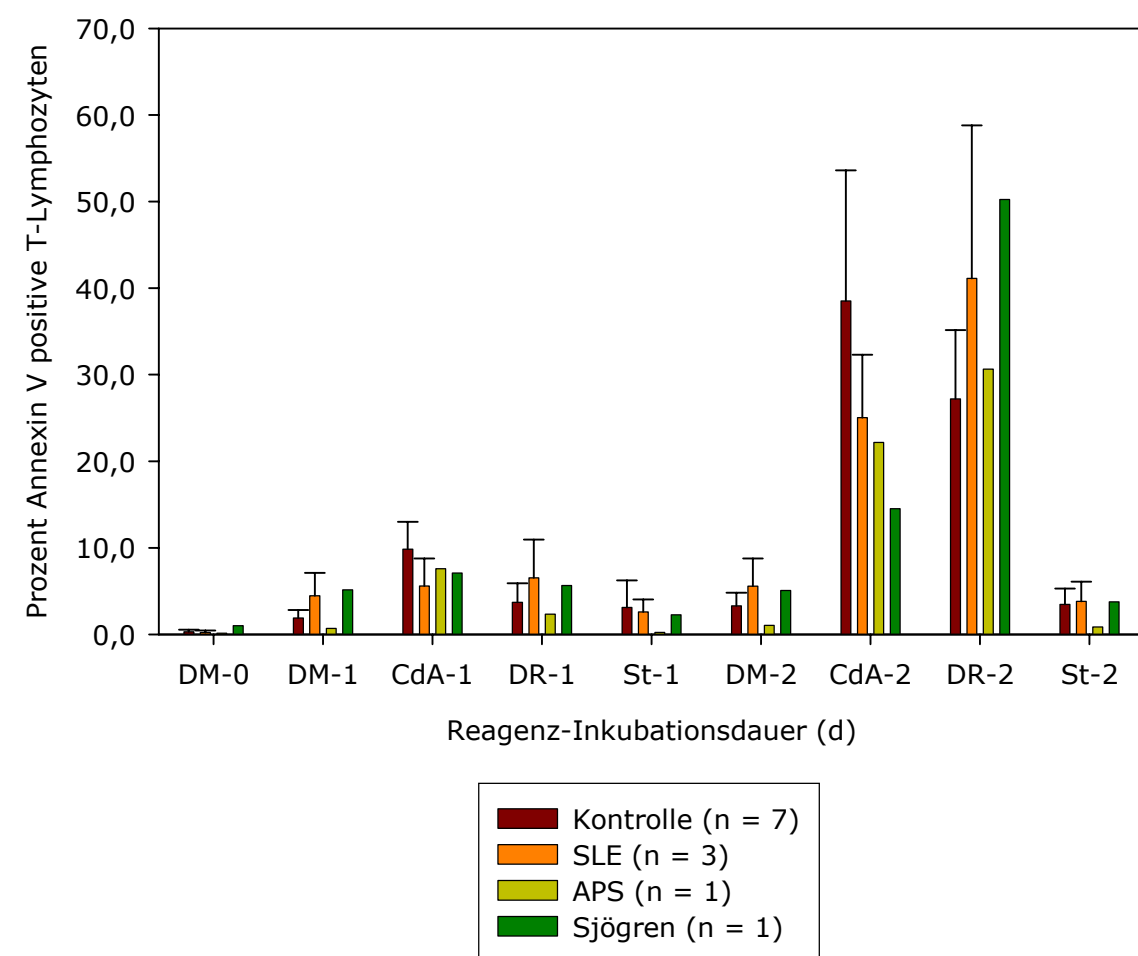


Abb. 3.31: Annexin V⁺ und Bcl-2⁺ T-Zellen bei verschiedenen Probanden und Reagenzien (DM: DMSO, CdA: 2-Chloro-2'-deoxyadenosin, DR: 2-Deoxy-D-ribose, St: Staurosporin)

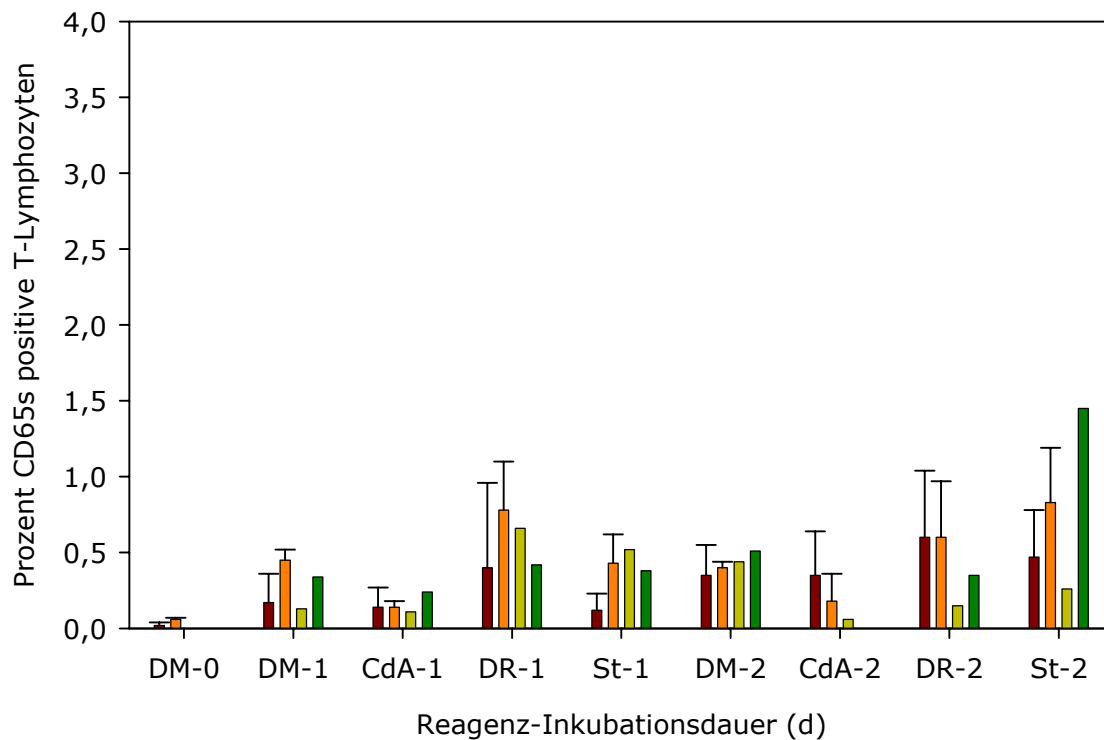
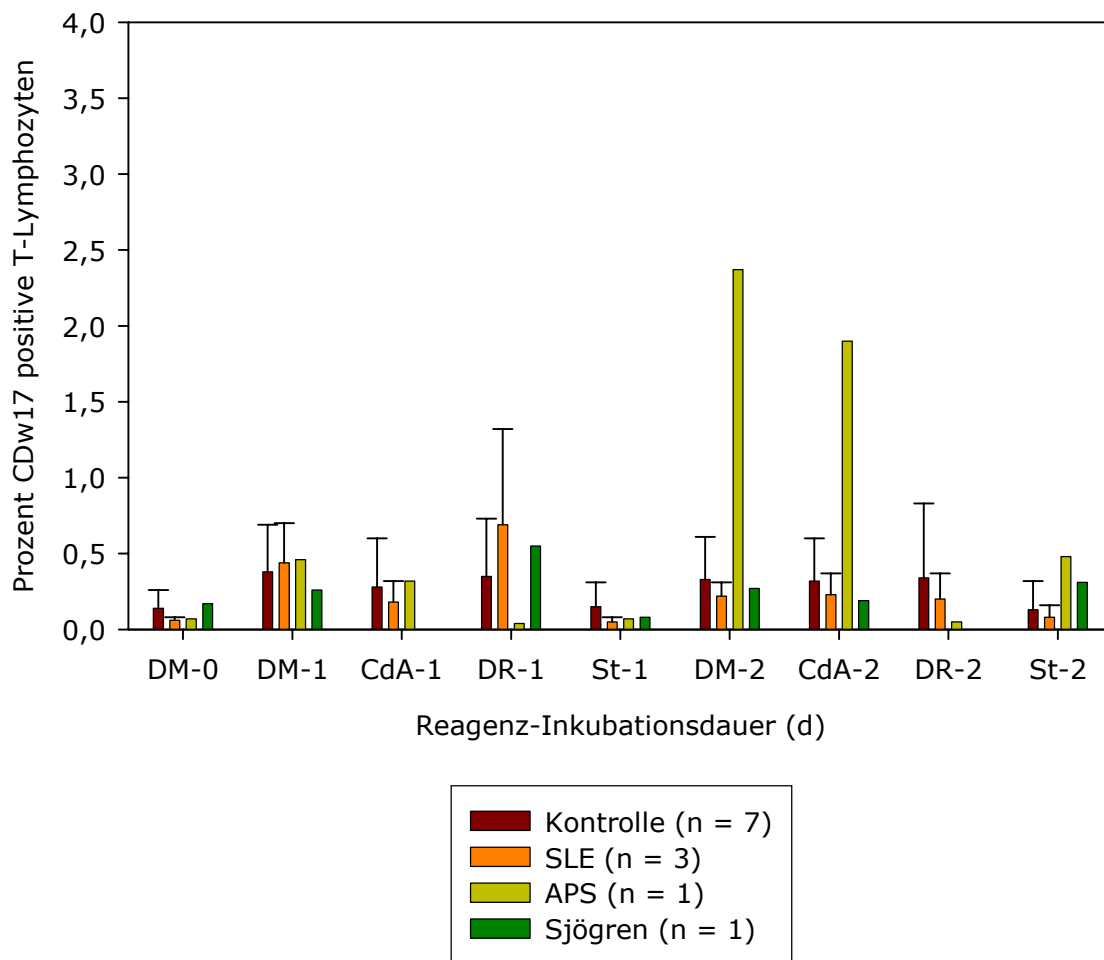


Abb. 3.32: CDw17⁺ und CD65s⁺ T-Zellen bei verschiedenen Probanden und Reagenzien (DM: DMSO, CdA: 2-Chloro-2'-deoxyadenosin, DR: 2-Deoxy-D-ribose, St: Staurosporin)

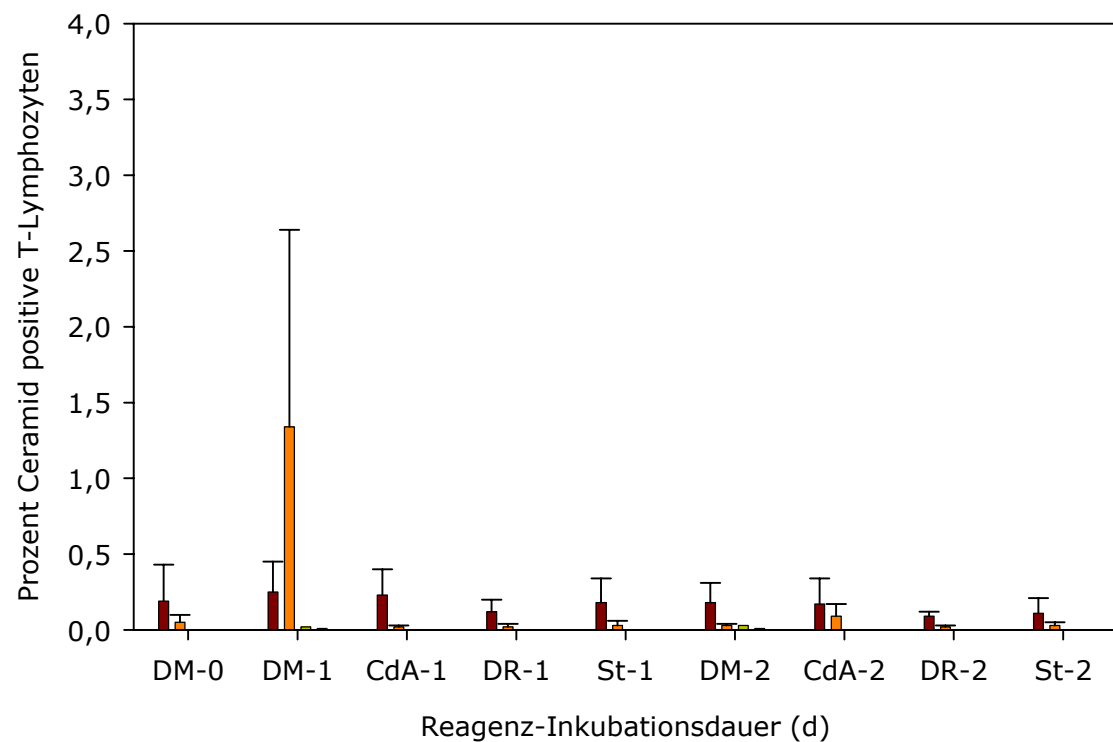
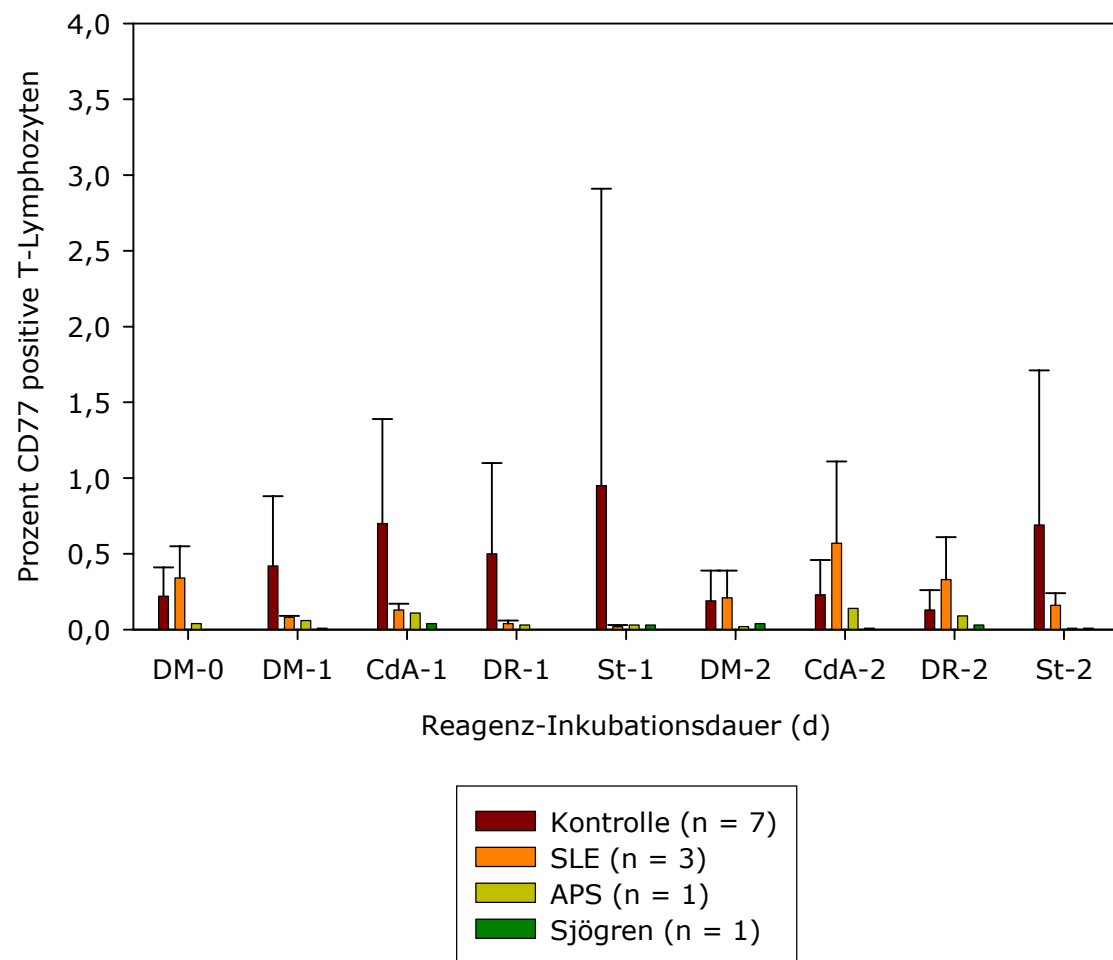


Abb. 3.33: CD77⁺ und Ceramid⁺ T-Zellen bei verschiedenen Probanden und Reagenzien (DM: DMSO, CdA: 2-Chloro-2'-deoxyadenosin, DR: 2-Deoxy-D-ribose, St: Staurosporin)

3.4.3 Induktion der T-Zellen von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen mit 2-Deoxy-D-ribose

Unter Berücksichtigung der beiden vorherigen Versuchsreihen sollte in dieser Studie ein umfassender Vergleich der apoptotischen T-Zellen der Kontrollspender und der Autoimmunpatienten erfolgen. Die Reduktion auf einen Apoptoseinduktor und einen Zeitraum sollte die Möglichkeiten der T-Zell-Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie erweitern.

Neben vier Patienten mit Sjögren's Syndrom und jeweils einem Patienten mit nicht anbehandelter RA oder Kollagenose sollten auch zwei unterschiedliche Gruppen innerhalb der Kontrollpersonen gemessen werden. Die Ursache dieser Unterteilung war die Entdeckung eines Einzelnukleotidpolymorphismus im Gen des HA-1 im Arbeitskreis. Dieser Polymorphismus hat eine signifikant höhere Frequenz bei den untersuchten Autoimmunpatienten als bei den gesunden Probanden. Der größte Teil der Bevölkerung ist bezüglich dieses Polymorphismus homozygot, es können aber auch gesunde heterozygote Probanden identifiziert werden.

Methodik: Die Ansätze und die Färbungen wurden nach **2.2.3**, die Analyse der Messungen nach **2.2.5** angepasst.

Ergebnisse: In Abb. 3.34 sind die Ergebnisse der Annexin V-, Bcl-2- und JC-1-Messungen für die verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Deutliche Differenzen sind nur vereinzelt festzustellen.

Die Messung des Annexin V-Signals an der Oberfläche der T-Zellen erbrachte bei den sofort gemessenen Ansätzen einen Anteil von 0,3 – 1,8 %, wobei der Mittelwert der Patienten mit Sjögren's Syndrom am höchsten lag (siehe Abb. 3.34). Diese Durchschnittswerte an Annexin V⁺/CD3⁺ Zellen stiegen in den Lösungsmittelansätzen nach 48 h Inkubation auf 1 – 3 % leicht an. Die Zugabe von 2-Deoxy-D-ribose führte nach zwei Tagen bei den homozygoten Kontrollen zu durchschnittlich 26 % Annexin V⁺ T-Zellen. Für die heterozygoten Kontrollen wurden mit durchschnittlich 21,5 % etwas weniger und bei den Patienten mit Sjögren's Syndrom mit 34 % mehr Annexin V⁺ T-Zellen gemessen. Die Einzelwerte der beiden anderen Patienten lagen im Bereich der Kontrollen (Kollagenose-Patient: 25 %) oder darunter (RA-Patient: 15 %). Die PS-Exposition infolge der Induktion der Apoptose ist bei den T-Zellen gesteigert, die von Patienten mit Sjögren's Syndrom stammen. Die Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen sind hingegen gering.

Die Bestimmung der Bcl-2-Werte erbrachte schon vor der Inkubation relativ viele positive T-Zellen (siehe Abb. 3.34). Konnte bereits für homozygote und heterozygote Kontrollpersonen ein relativ hoher Anteil an Bcl-2⁺ T-Zellen (40 und 47 %) gemessen werden, so wurde bei den Patienten mit Sjögren's Syndrom ein höherer Mittelwert (57 %) und bei den Patienten mit Kollagenose (ca. 22 %) und RA (ca. 28 %) ein geringerer Prozentwert bestimmt. Nach zwei Tagen erhöhten sich bei allen Gruppen die mittleren Prozentwerte an Bcl-2⁺/CD3⁺ Zellen. Waren bei den Ansätzen mit dem Lösungsmittel noch erkennbare Unterschiede zwischen den Kontrollen (jeweils ca. 67 %) und den Patienten mit Sjögren's Syndrom (74 %), Kollagenose (39 %) oder RA (63 %) zu detektieren, verringerten sich diese in den Ansätzen mit der 2-Deoxy-D-ribose. Hier war interessanterweise der geringste Anteil an Bcl-2⁺ T-Zellen bei den Sjögren-Patienten (89 %) zu messen, während für die übrigen Probanden ein Prozentanteil von deutlich über 90 % bestimmt werden konnte. Generell konnten nach der Induktion der Apoptose zwischen den Gruppen nur geringe Unterschiede detektiert werden.

Eine dritte Charakterisierung apoptotischer T-Zellen erfolgte über die Färbung mit JC-1 (siehe Abb. 3.34). Dieser Farbstoff färbt die intrazellulären Mitochondrien grün, wenn der Protonengradient über der Mitochondrienmembran infolge der Apoptose oder direkter Schädigungen zusammengebrochen ist [68].

Die sofort gemessenen und JC-1 (grün) gefärbten T-Zellen ergaben bei allen Gruppen einen Anteil von ca. 30 %, lediglich der Patient mit Kollagenose lag mit 37 % etwas höher. Diese Mittelwerte veränderten sich nach zwei Tagen in den Ansätzen mit dem Lösungsmittel nur wenig bis auf den Kollagenose-Patienten (ca. 19 % JC-1⁺ T-Zellen). Die Inkubation mit dem Stimulus 2-Deoxy-D-ribose führte zu einem starken Anstieg der nicht vitalen JC-1⁺ T-Zellen, erbrachte jedoch nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der Kontrollpersonen (homozygote: 74 % und heterozygote: 69 %). Höhere Durchschnittswerte wurden bei den Patienten mit Sjögren's Syndrom gemessen (86,3 %), während die beiden übrigen Patienten Werte im Bereich der Kontrollen (RA: 76 %) oder darunter (Kollagenose: 58 %) hatten. Auch bei dieser Färbung zeigt sich eine erhöhte Empfindlichkeit der T-Zellen der Sjögren-Patienten gegenüber der 2-Deoxy-D-ribose.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Induktion der Apoptose mit 2-Deoxy-D-ribose bei den T-Zellen von Patienten mit Sjögren's Syndrom an der Oberfläche zu einer erhöhten Exposition von PS und in den Zellen zu einer

stärkeren Schädigung der Mitochondrien führt. Die Tatsache, dass zwischen den beiden Kontrollgruppen keine deutlicheren Unterschiede zu finden sind, zeigt, dass dieser Polymorphismus keinen Einfluss auf die Bereitschaft der T-Zellen zur Apoptose hat. Die beiden übrigen Patientengruppen sind für eine stichhaltige Aussage mit nur je einem Vertreter zu klein.

Der Vergleich der Patienten und Kontrollpersonen ergibt in dieser Studie nur wenige messbare Differenzen. Daher sollte in einer weiteren Versuchsreihe die unspezifische Apoptoseinduktion mittels 2-Deoxy-D-ribose durch eine spezifischere mittels CD95-Antikörper ersetzt werden.

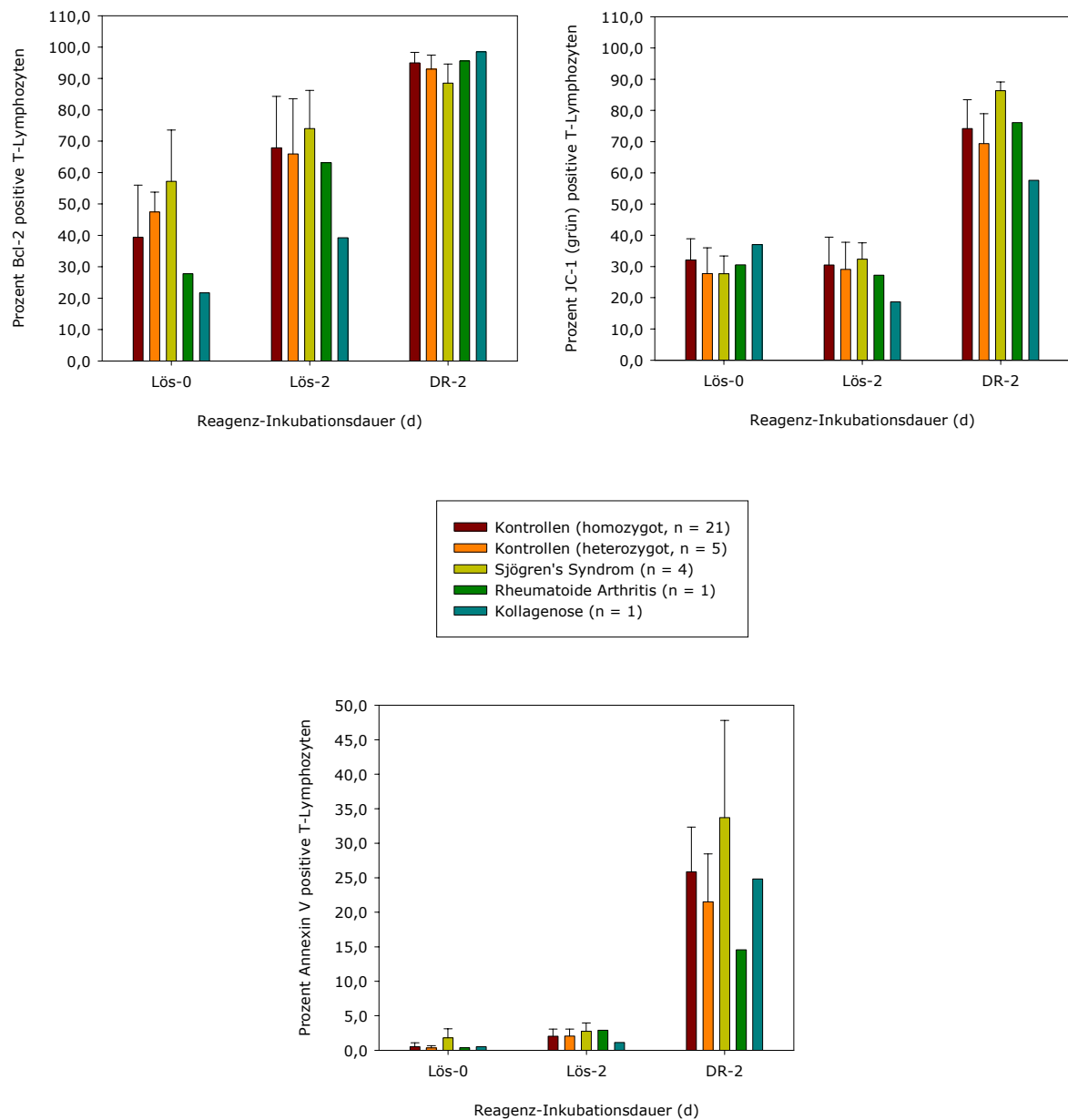


Abb. 3.34: Bcl-2, JC-1 und Annexin V positive T-Zellen nach Apoptoseinduktion (Lös: Lösungsmittelkontrolle, DR: 2-Deoxy-D-ribose)

3.4.4 Induktion der T-Zellen von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen mit Anti-CD95

Nachdem die Induktion der Apoptose über Chemikalien in den vorherigen Experimenten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und Autoimmunpatienten erbracht hatte, sollte in dieser Versuchsreihe ein Vergleich der Probanden unter spezifischer Apoptoseinduktion erfolgen. Die Leukozyten der Ansätze sollten dazu mit dem CD95-Antikörper inkubiert werden, und die apoptotischen T-Zellen detektiert und charakterisiert werden.

Der Aufbau und die Funktion von CD95 sind unter **1.4.2** beschrieben. Als Ausgangspunkt sollte das modifizierte Protokoll von M. Bijl et al. verwendet werden [38]. Außerdem sollte die Detektion der Ceramide wiederholt werden, um eventuelle Differenzen zwischen den Probanden feststellen zu können.

Methodik: Entsprechend den Vorgaben wurden die Inkubationen und Färbungen angepasst (siehe **2.2.3**) und die Auswertung der Messungen nach **2.2.5** durchgeführt.

Ergebnisse: In den Abb. 3.35 bis 3.37 sind die Ergebnisse der einzelnen Probandengruppen für die gemessenen Antigene dargestellt. Dabei zeigen sich bei einigen Antigenen messbare Unterschiede zwischen den Kollektiven.

Die Durchschnittswerte der Annexin V⁺ T-Zellen (siehe Abb. 3.35) ergaben bei den Kontrollpersonen und den Patienten mit Sjögren's Syndrom nur zwischen den sofort und den später gemessenen Ansätzen einen Anstieg von 0,3 auf 2 bis 5 %; innerhalb der Inkubationen ergaben sich jedoch nur geringe Unterschiede. Wesentlich deutlichere Differenzen wurden bei den SLE-Patienten gemessen: Hier stieg der Anteil der Annexin V⁺/CD3⁺ Zellen von 0,4 auf 8 bzw. 14 % nach einem Tag und auf 7 bzw. 5 % nach zwei Tagen. Offensichtlich verursacht die Bindung von Anti-CD95 bei den T-Zellen der SLE-Patienten eine erhöhte Exposition von PS auf der Oberfläche.

Ein umgekehrtes Bild liefert der Vergleich der CD77-Expression zwischen den Probanden und Ansätzen in Abb. 3.35. Die gemessenen Mittelwerte der Kontrollpersonen und der Sjögren-Patienten waren nach einem Tag von ca. 0,7 auf ca. 6,5 % im PBS-Ansatz und auf ca. 12 % im Antikörperansatz gestiegen. Nach zwei Tagen konnten bei beiden Gruppen nur noch ca. 3 respektive ca. 7 % CD77⁺ T-Zellen gemessen werden. Dagegen wurden bei den SLE-Patienten mit 0,7 bzw. 8 % nach einem Tag und 1 bzw. 5 % nach zwei Tagen geringere Expressionen festgestellt. Allgemein zeigen die Ergebnisse einen messbaren

Anstieg der CD77-Expression auf den T-Zellen aller Probanden nach der Antikörpergabe.

Die in Abb. 3.36 dargestellten Durchschnittswerte der CDw17-Messung ergaben bei den Kontrollpersonen 1,5 - 2 % an positiven T-Zellen, unabhängig von der Inkubation und des Zeitrahmens. Bei den Sjögren-Patienten konnte nur ein Unterschied zwischen den sofort gemessenen und den inkubierten T-Zellen festgestellt werden. Die Werte erhöhten sich von 0,7 auf ca. 3 % nach einem und zwei Tagen Inkubation. Für die SLE-Patienten konnte eine stärkere Zunahme der CDw17⁺ T-Zellen von 0,5 auf ca. 6 % nach einem Tag gemessen werden. Dieser Anteil verringerte sich nach zwei Tagen auf 3 bis 4 %. Bei CDw17 kann vor allem bei den Patienten ein Anstieg der positiven T-Zellen im Zeitverlauf festgestellt werden und dies weitgehend unabhängig vom CD95-Antikörper.

Etwas anders zeigen sich die Mittelwerte der CD65s⁺ T-Zellen (siehe Abb. 3.36): Die Expression dieses Antigens erhöhte sich nach einem Tag bei allen Probanden von ca. 0,2 auf 1 bis 3 % im Lösungsmittelansatz und auf ca. 4 % im Antikörperansatz. Die Messungen nach zwei Tagen erbrachten für die SLE-Patienten mit ca. 5 % CD65s⁺ T-Zellen in beiden Ansätzen mehr Zellen als die Kontrollpersonen und die Sjögren-Patienten mit jeweils ca. 2 %. Generell wird das Antigen CD65s auf den T-Zellen schwach exponiert, ohne dass eine Verbindung mit der Zugabe von Anti-CD95 erkennbar ist.

Die Durchschnittswerte an Bcl-2⁺/CD3⁺ T-Zellen in Abb. 3.37 zeigen bei allen drei Kollektiven hauptsächlich zwischen den sofort gemessenen und den inkubierten Ansätzen erkennbare Differenzen. Die detektierten Mittelwerte der gesunden Probanden stiegen von 13 % bei sofortiger Messung auf ca. 45 % der T-Zellen nach einem und zwei Tagen unabhängig von der Antikörpergabe. Sowohl bei den Patienten mit Sjögren's Syndrom als auch mit SLE wiederholte sich dieser Anstieg. An Bcl-2⁺ T-Zellen wurden für die Sjögren-Patienten Mittelwerte von sofort 22 %, nach einem Tag von ca. 55 % und nach zwei Tagen von ca. 63 % gemessen. Bei den SLE-Patienten wurden mit 31, ca. 65 und ca. 72 % tendenziell höhere Durchschnittswerte gemessen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die Zugabe des Antikörpers keine wesentliche Änderung der Expression von Bcl-2 in den T-Zellen aller Probanden bewirkt.

Die Detektion vitaler T-Zellen über die orange JC-1-Fluoreszenz lieferte Prozentwerte, die relativ unabhängig vom CD95-Antikörper mit zunehmender Inkubationszeit bei allen Probanden abnahmen (siehe Abb. 3.37). Für die

Kontrollpersonen konnte ein Abfall der vitalen T-Zellen von 80 über 67 auf 47 % bestimmt werden. Pro Tag konnten somit 20 % weniger vitale T-Zellen detektiert werden. Die Sjögren-Patientenproben lieferten Durchschnittswerte von 80, 77 und 62 % JC-1 (orange)⁺ T-Zellen. Der wesentliche Unterschied lag zwischen den ersten und zweiten Tag der Inkubation. Dagegen konnte bei den SLE-Patienten eine stetige Abnahme der vitalen T-Zellen detektiert werden. Die Mittelwerte gingen von 93 über ca. 70 auf ca. 55% Anteil zurück. Die Abnahme der vitalen T-Zellen vollzieht sich mehr infolge der Zeit als der Antikörpergabe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass dieser Versuchsansatz zwischen den gesunden Probanden und den Autoimmunpatienten bezüglich der Exposition von PS und CDw17 und der Expression von Bcl-2 leichte Differenzen messbar macht. Generell jedoch zeigen sich alle untersuchten Probanden gegenüber Anti-CD95 eher unempfindlich. Daher sind in den Ansätzen zu wenige apoptotische T-Zellen, die gemessen und charakterisiert werden können.

In parallel durchgeführten Messreihen sollten zusätzlich spezielle Leukozyten des CD1-Systems identifiziert werden, um auch für dieses System Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Autoimmnukrankheiten zu finden.

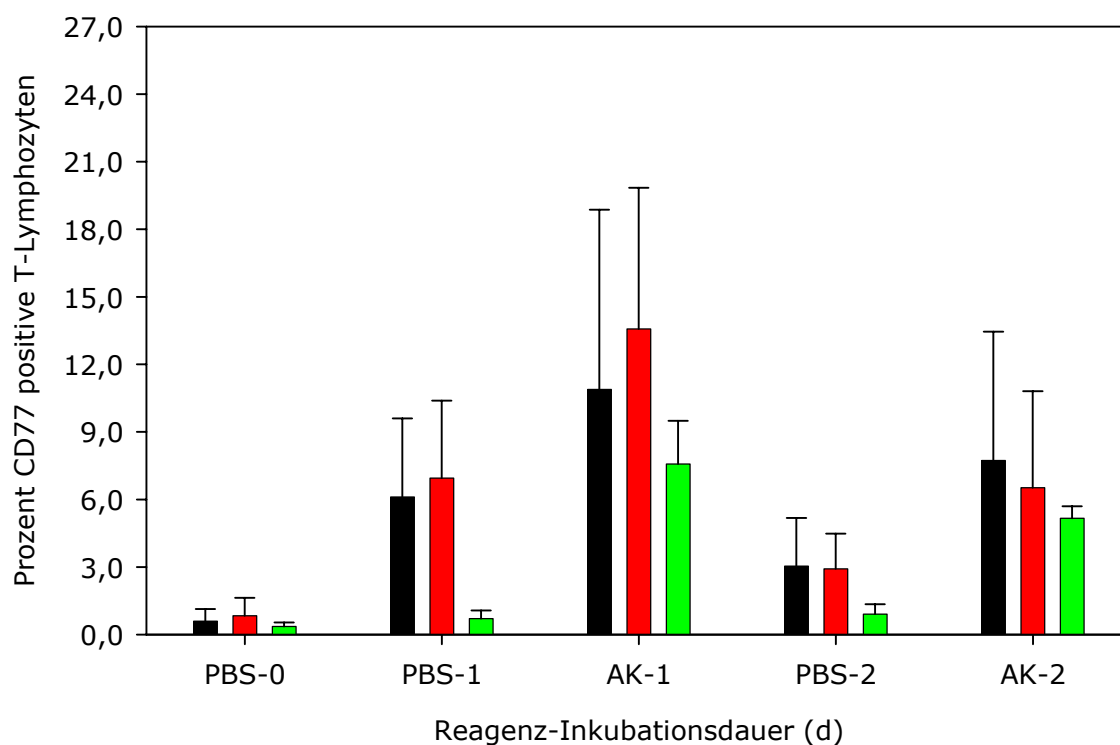
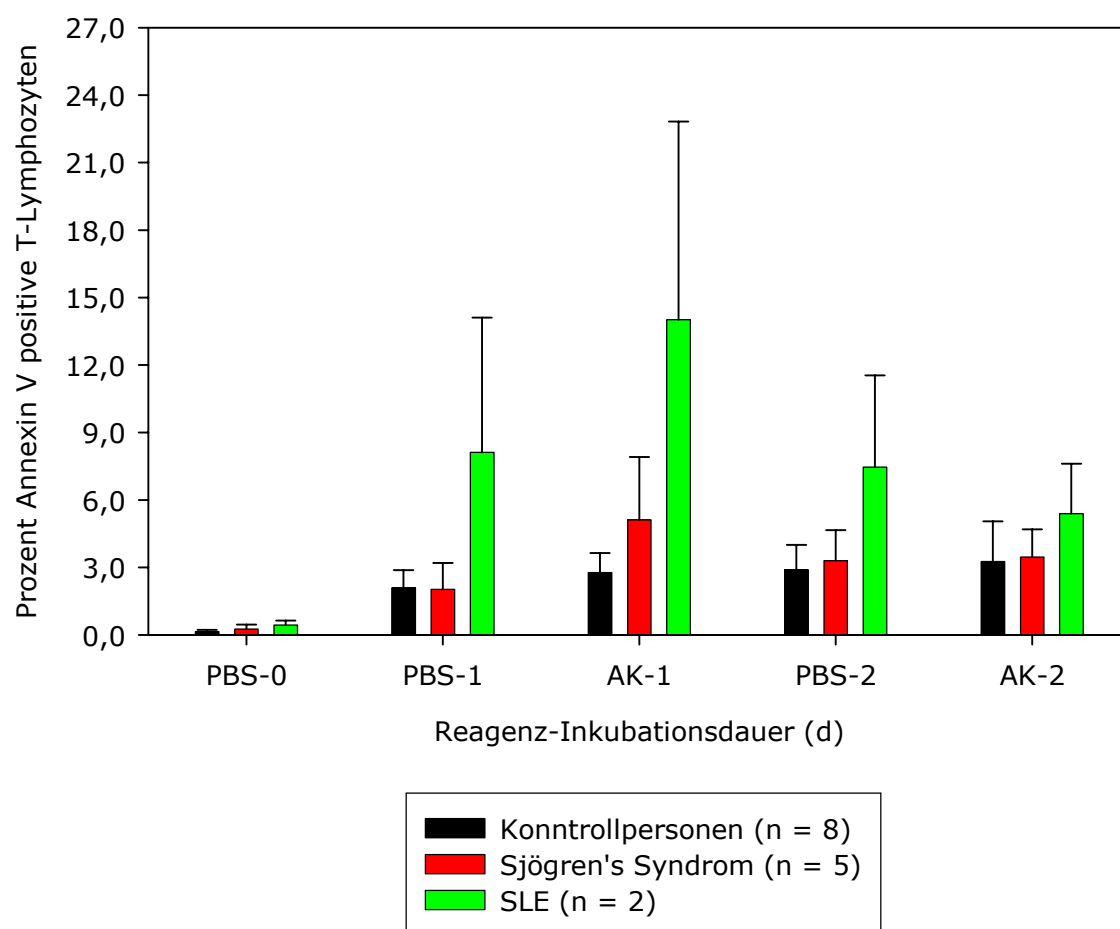


Abb. 3.35: Anteil der Annexin V⁺ und CD77⁺ T-Lymphozyten der verschiedenen Probanden und Ansätze (AK: CD95-Antikörper)

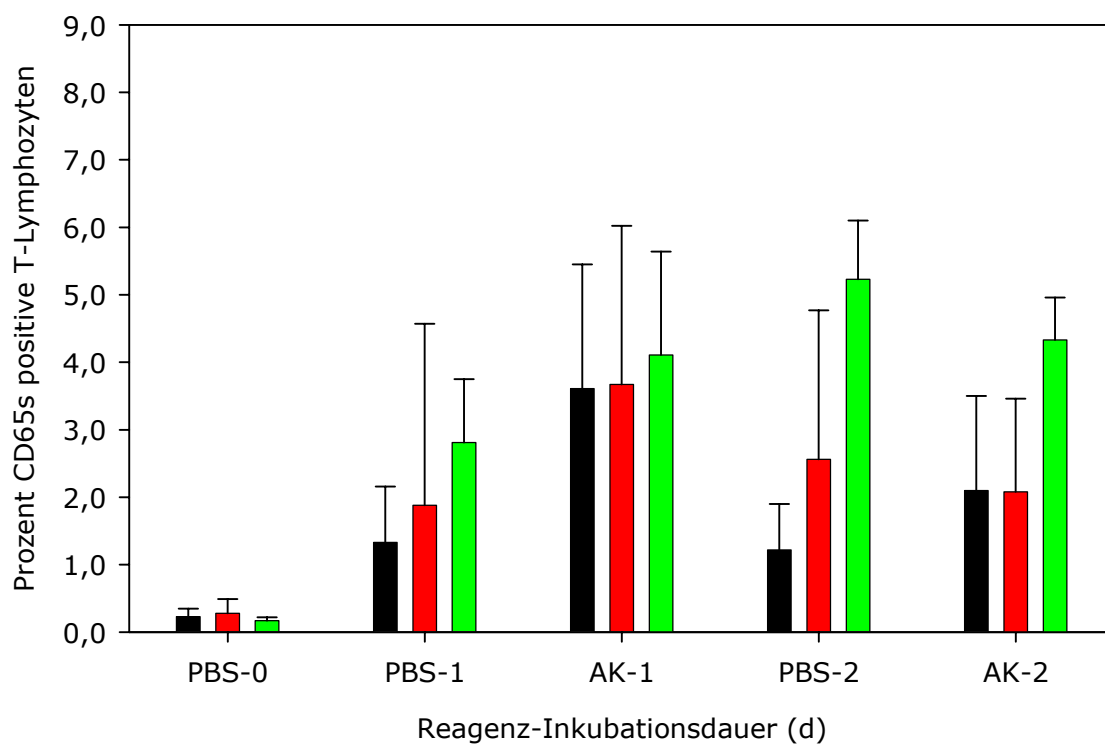
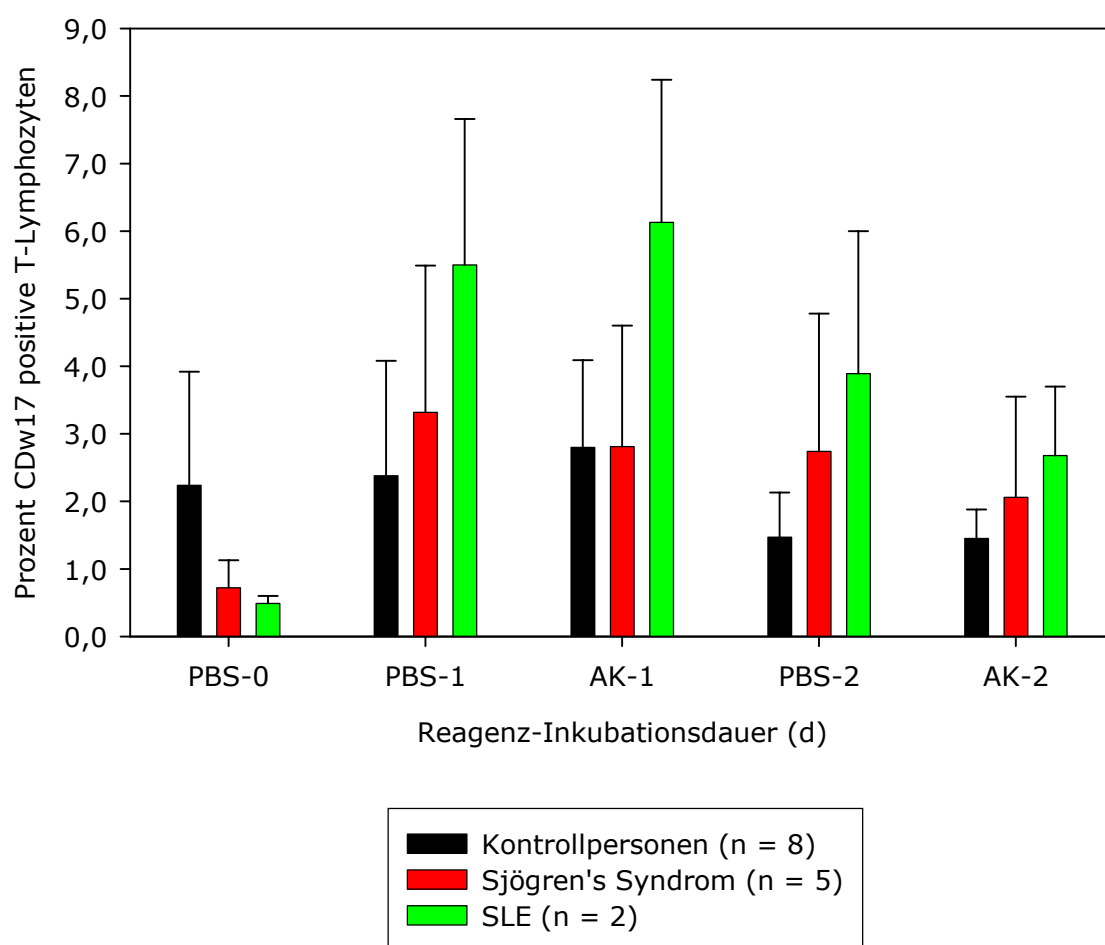


Abb. 3.36: Anteil der CDw17⁺ und CD65⁺ T-Lymphozyten der verschiedenen Probanden und Ansätze (AK: CD95-Antikörper)

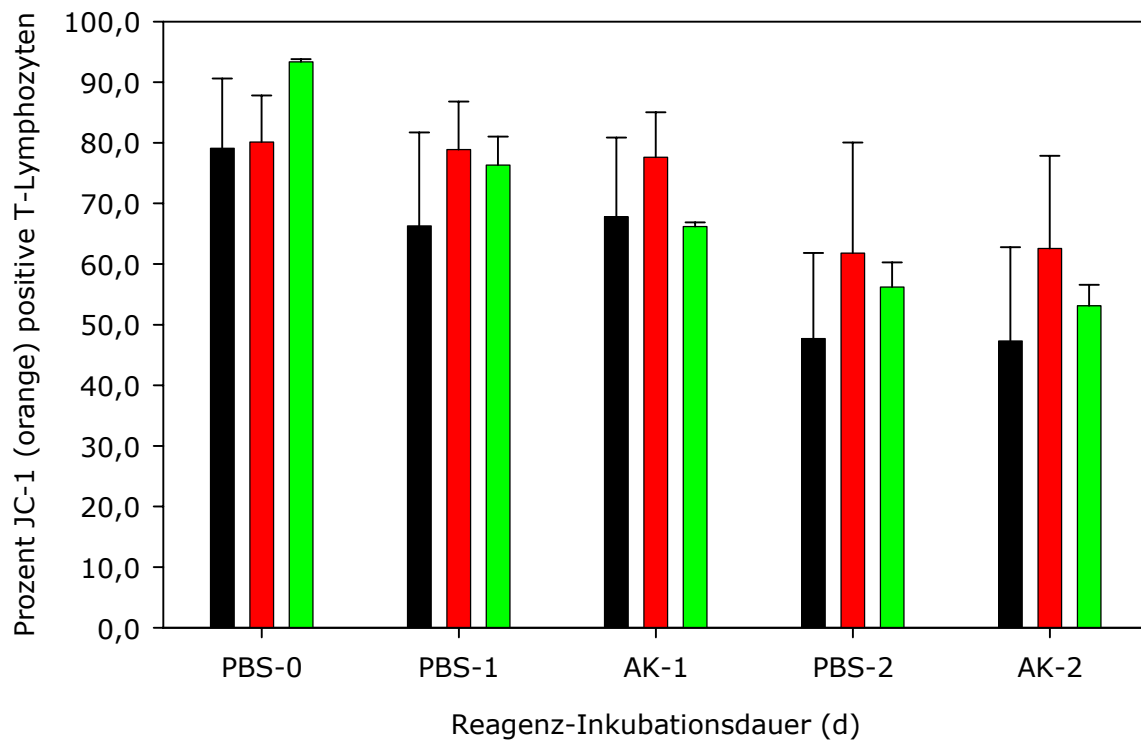
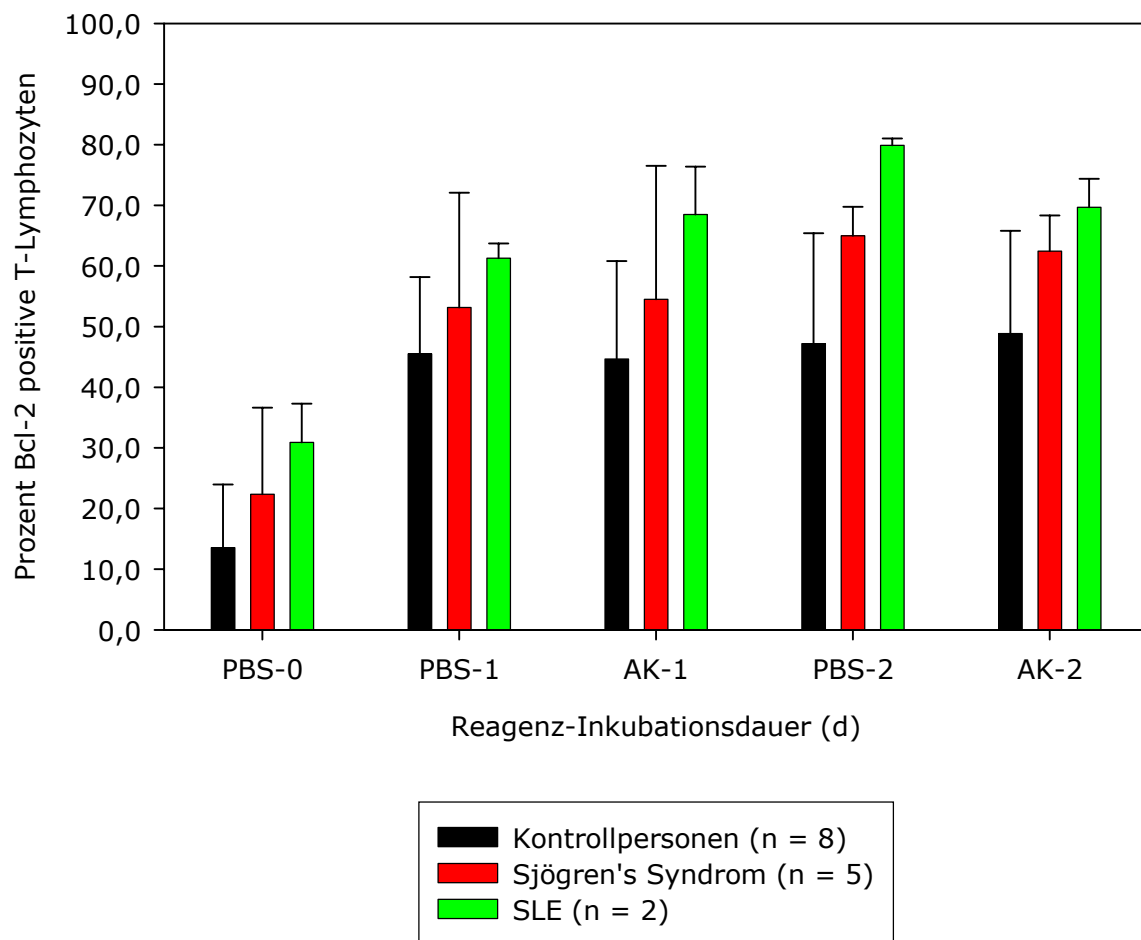


Abb. 3.37: Anteil der Bcl-2⁺ und JC-1 (orange)⁺ T-Lymphozyten der verschiedenen Probanden und Ansätze (AK: CD95-Antikörper)

3.5 Charakterisierung von NK-T-Zellen und Dendritischen Zellen im CD1-System

In diesem Abschnitt sollten in unabhängigen Messungen zwei wichtige Leukozytengruppen des CD1-Systems detektiert und verglichen werden. Die Bedeutung dieses Antigenpräsentationssystem liegt in der Initiierung einer Immunantwort gegen lipophile Antigene, die unter anderem zur Aktivierung von NK-T-Zellen führt (siehe **1.2.3**).

Da für Autoimmunerkrankungen einige Verbindungen mit dem CD1-System entdeckt worden waren, sollten in zwei Messreihen die gesunden und erkrankten Probanden auf ihre potenziellen Differenzen charakterisiert werden.

Eine erste Messreihe sollte den Anteil der NK-T-Zellen an allen T-Lymphozyten im Vollblut für die einzelnen Gruppen bestimmen. Sollten NK-T-Zellen an der Pathogenese der Autoimmunkrankheiten beteiligt sein, könnten sich dies in einem abweichenden prozentualen Anteil niederschlagen.

Eine zweite Untersuchung sollte eine Bestimmung der Absolutzellzahlen an CD1c⁺ und CD1d⁺ DCs im Vollblut der Probanden beinhalten. Auch für diese Leukozyten wäre eine pathogene Funktion denkbar, die sich in veränderten Werten widerspiegeln könnte.

3.5.1 Bestimmung der Frequenz von NK-T-Zellen im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen

Die Zielsetzung dieser Reihenfärbung sollte die vergleichende Identifizierung von NK-T-Zellen im unbehandelten Vollblut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Kontrollpersonen sein. Den NK-T-Zellen wurde eine große Potenz zur Sekretion von Zytokinen nachgewiesen, und es konnten bei einigen der angeführten Erkrankungen Hinweise auf eine Beteiligung der NK-T-Zellen gefunden werden.

Eine Möglichkeit NK-T-Zellen zu identifizieren sind die rekombinant hergestellten CD1d-Moleküle. Die Beladung dieser mit α -Galactosylceramid und die Verknüpfung zu einem fluorochromkonjugierten Tetramer lassen ihre Anwendung im DFZ zu [37]. Da diese Moleküle nicht verfügbar waren, musste der Nachweis der NK-T-Zellen über Antikörperfärbungen erfolgen (siehe 1.2.3).

Methodik: Die Detektion der Zellen erfolgte gemäß 2.2.2 und die Analyse der Messungen nach 2.2.5.

Ergebnisse: Die Tab. 3.13 zeigt die durchschnittlichen Prozentzahlen der einzelnen T-Zellsubpopulationen mit ihren Standardabweichungen.

<i>T-Zellsubpopulation</i>	<i>Kp.</i> <i>(n = 9)</i>	<i>RA</i> <i>(n = 13)</i>	<i>SLE</i> <i>(n = 13)</i>	<i>APS</i> <i>(n = 5)</i>	<i>SLE/APS</i> <i>(n = 6)</i>
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	56,04	72,06	56,74	63,98	59,58
Stdabw	7,94	10,79	12,08	4,22	9,20
CD3 ⁺ /CD4 ⁺ /V α 24 ⁺	0,60	0,62	0,40	0,57	0,49
Stdabw	0,13	0,29	0,11	0,08	0,33
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	32,16	22,19	35,14	29,51	32,78
Stdabw	4,19	9,79	9,49	3,66	8,88
CD3 ⁺ /CD8 ⁺ /V α 24 ⁺	0,42	0,51	0,56	0,25	0,35
Stdabw	0,21	0,33	0,37	0,03	0,30
CD3 ⁺ /CD4 ⁻ /CD8 ⁻	6,81	2,58	4,95	3,54	3,35
Stdabw	8,13	1,69	3,83	1,60	1,58
CD3 ⁺ /CD4 ⁻ /CD8 ⁻ /V α 24 ⁺	0,05	0,02	0,04	0,04	0,05
Stdabw	0,04	0,02	0,04	0,03	0,07

Tab. 3.13: Prozentwerte der einzelnen T-Zellsubpopulationen (Kp.: Kontrollpersonen)

Die Messungen der beiden Hauptpopulationen der T-Zellen ergaben für die RA-Patienten einen durchschnittlich wesentlich höheren Anteil an Th-Zellen (72 %) und einen dementsprechend verminderten Anteil an CTLs (22 %). Alle anderen Gruppen hatten in etwa eine Aufteilung von 60 % Th-Zellen und 30% CTLs. Der Anteil von $V\alpha 24^+$ Th-Zellen und CTLs lag bei allen untersuchten Personengruppen in einem Bereich von 0,3 bis 0,6 % und zeigte keine deutlichen Abweichungen.

In der Subpopulation der doppelnegativen ($CD4^-/CD8^-$) T-Zellen waren bei den Kontrollpersonen und den SLE-Patienten höhere Prozentwerte (6,8 und 5 %) detektiert worden als bei den übrigen Gruppen. Allerdings waren diese auch von höheren Standardabweichungen begleitet, weshalb bei den doppelnegativen T-Zellen zwischen den Probanden eher geringe Unterschiede zu erkennen waren.

Die Prozentwerte der NK-T-Zellen ($CD3^+/CD4^-/CD8^-/V\alpha 24^+$) waren bei allen gemessenen Blutproben an der Grenze der Nachweisbarkeit. Bei einem durchschnittlichen Anteil von 0,02 - 0,05 % ist es nur eingeschränkt möglich diese seltenen Zellen von Debris, der unspezifisch Antikörper binden kann, abzugrenzen.

Das Fazit dieser Messreihe ist, dass der Anteil an NK-T-Zellen im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen sehr gering ist, und keine Unterschiede feststellbar sind. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass die NK-T-Zellen in den einzelnen Personengruppen verschiedenen Funktionen oder eine unterschiedliche Reaktivität haben; jedoch machen die geringen Zellzahlen eine funktionelle Charakterisierung unmöglich.

In einer letzten nachfolgenden Messreihe sollten die CD1 exprimierenden DCs im Vollblut nachgewiesen und innerhalb der Probandengruppen verglichen werden.

3.5.2 Bestimmung der Frequenz von CD1c⁺ und CD1d⁺ Dendritischen Zellen im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen

Die niedrigen Prozentwerte der NK-T-Zellen und die nicht feststellbaren Unterschiede zwischen den Probanden hatten eine weitere parallele Messreihe zur Folge. In dieser sollten mit den CD1-exprimierenden DCs die Antagonisten der NK-T-Zellen und anderer lipidspezifischer T-Zellen im Vollblut der Kontrollpersonen und der Autoimmunpatienten näher charakterisiert und gezählt werden. Der Schwerpunkt der Messungen sollte auf CD1c und CD1d liegen, da eine Voruntersuchung ergeben hatte, dass die Färbung der Antigene CD1a und CD1b im Vollblut keine eindeutigen Signale liefert (Daten nicht gezeigt).

Die Annahme war, dass es bei den Patienten zu einer fehlerhaften Induktion einer Autoimmunantwort über CD1-präsentierte lipophile Antigene kommen könnte. Dies könnte als chronische Inflammation die Erkrankung herbeiführen. Die fatalen Auswirkungen einer mittels DCs falsch oder künstlich induzierten Immunreaktion sind beschrieben [235].

Methodik: In **2.2.2** wurde das Vorgehen zur Detektion und Zählung der Zielzellen und in **2.2.5** die Auswertung der Messungen beschrieben.

Ergebnisse: In Tab. 3.14 sind die Anzahl der gemessenen Probanden und in Abb. 3.38 die Absolutzellzahlen der DCs für die untersuchten Personen dargestellt. Die Abbildung zeigt erkennbare Unterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den Patienten.

Anzahl	Patientengruppe
14	Kontrollpersonen (Kontrollen)
3	Rheumatoide Arthritis (RA)
4	Primäres Antiphospholipid Syndrom (APS)
14	Systemischer Lupus Erythematosus (SLE)
7	Sjögren's Syndrom (Sjögren)
24	SLE mit sekundärem APS (SLE/APS)

Tab. 3.14: Patientenfallzahlen

Die höchsten Absolutzahlen konnten bei den Kontrollpersonen gezählt werden (siehe Abb. 3.38): An CD1c⁺ DCs wurden ca. 9.500 Zellen pro ml Vollblut und an CD1d⁺ DCs ca. 9.600 pro ml gezählt. Neben den fast identischen Zellzahlen

konnte auch eine relativ gleiche Standardabweichung errechnet werden. Man kann daher annehmen, dass CD1c und CD1d auf denselben DCs exprimiert wird. Für die untersuchten Autoimmunpatienten wurden bei allen Gruppen weniger CD1c⁺ und CD1d⁺ DCs bestimmt: Die Patienten mit primären APS (CD1c⁺: ca. 7.400 und CD1d⁺: ca. 8.300) hatten dabei die höchsten Durchschnittswerte und wurden von den Sjögren-Patienten gefolgt, deren Zellzahlen um etwa 1000 pro ml Vollblut niedriger lagen (CD1c⁺: ca. 6.600 und CD1d⁺: ca. 7.400). Ein weiteres Absinken der DCs wurde bei den SLE-Patienten mit etwa 5.100 an CD1c⁺ und etwa 6.300 an CD1d⁺ DCs bestimmt. Konnte bei diesen Patienten auch ein sekundäres APS diagnostiziert werden, sanken die gemessenen Durchschnittswerte fast auf die Hälfte der Kontrollpersonen (CD1c⁺: ca. 4.600 und CD1d⁺: ca. 5.300). Die niedrigsten Mittelwerte wurden für die RA-Patienten mit ca. 3.500 CD1c⁺ und ca. 3.700 CD1d⁺ DCs festgestellt; dies entspricht in etwa 40 % der Zellzahlen der Kontrollpersonen.

Als Schlussfolgerung kann man ziehen, dass die Absolutzellzahlen der beiden DC-Gruppen bei den Kontrollpersonen am höchsten ist. Desweiteren können bei allen Probanden etwas mehr CD1d⁺ DCs bestimmt werden. Die Ursache für die reduzierten Zellzahlen ist unklar. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Patienten teilweise unter immunsuppressiver Behandlung stehen.

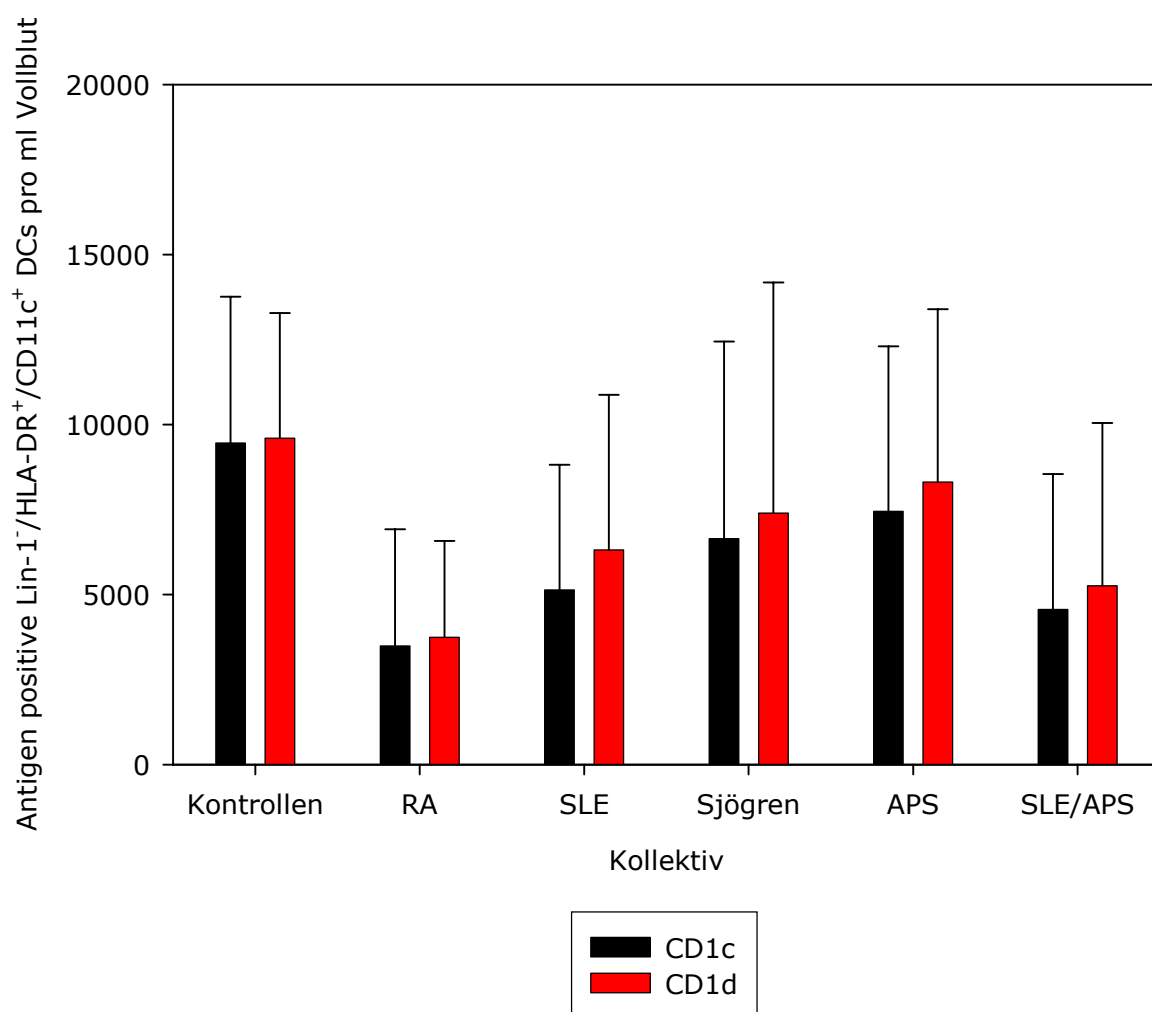


Abb. 3.38: Gegenüberstellung der CD1c⁺ und CD1d⁺ DCs im Vollblut von Autoimmunpatienten und Kontrollpersonen

4 Diskussion

Die hier vorgestellte Arbeit entwickelt mithilfe der Durchflusszytometrie Methoden zur *in vitro* Charakterisierung von Autoimmunerkrankungen und gewährt anhand verschiedener Experimente mit einfachen Vollblutproben neue Einblicke über die Bestimmung der Eigenschaften von autoantigenspezifischen Th-Zellen und über die Analyse des programmierten Zelltods der T-Zellen.

4.1 Stimulationsansatz

Die Etablierung eines Ansatzes zur Aktivierung und Identifizierung von antigen-spezifischen Th-Zellen in Vollblut mit dem Antigen TT begann mit der Austestung der Versuchsparameter auf ihre Notwendigkeit hin. Dieser Optimierung folgte die Erprobung von Methoden zur Steigerung der Detektierbarkeit der antigen-spezifischen Th-Zellen. Schließlich zeigte die Austestung anderer Antigene als TT und die Optimierung dieser Versuchsparameter die Flexibilität dieser Methodik.

Der Vergleich der Ergebnisse des transferierten Stimulationsprotokolls zur Detektion CMV-spezifischer T-Lymphozyten (siehe Tab. 3.1 in **3.1.1**) und die einfache Modifikation des Versuchsansatzes in Form einer Verlängerung der Stimulationsdauer von 6 auf 26 h (siehe Abb. 3.1 in **3.1.2**) zeigt eine deutliche Zunahme an aktivierten antigenpositiven Th-Zellen. Eine Antikoagulation mit Zitrat oder EDTA verhindert allerdings die Hochregulation der Aktivierungsmarker nach Antigengabe. Dies lässt sich damit erklären, dass beide Antikoagulanzen das Kalzium aus dem Vollblut weitgehend vollständig depletieren und damit den Kalzium-Einstrom bei der Aktivierung der T-Zellen verhindern [410].

Dagegen zeigen die Ansätze mit den unterschiedlichen Blutverdünnungsstufen keine großen Abweichungen voneinander (siehe Abb. 3.2 und 3.3 in **3.1.3**). Ein Blutanteil von 10 % führt in fast allen Ansätzen zu keiner erkennbaren Hochregulation der Aktivierungsmarker und ist damit suboptimal. Die Wahl von 33 % aufgrund des CD25-Signals hatte auch praktische Gründe, da unverdünntes Vollblut umständlicher in seiner Handhabung ist. Auch in anderen Fragestellungen mit Vollblutansätzen erweist sich eine Verdünnung als vorteilhafter [395].

Die Austestung der EDTA-Zugabe vor der Ernte erbrachte keinen Unterschied zwischen den Proben mit und ohne diesen Chelatbildner (siehe Abb. 3.4 in **3.1.4**). Die Überlegung war, das Kalzium über EDTA aus dem Medium zu

entfernen, um adhärenzte (T-)Zellen von der Kunststoffoberfläche des Reaktionsnapfs abzulösen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die T-Zellen nicht adhärenz sind bzw. der Anteil gering ist.

Mit der Durchführung der TT-Stimulationskinetik in **3.1.5** konnte gezeigt werden, dass die zuerst durchgeführte Inkubation über 6 h nicht ausreicht, um ein messbares Signal der Antigene zu erhalten (siehe Abb. 3.5). Offensichtlich benötigt das System der an der Stimulation beteiligten Leukozyten eine gewisse Zeit, bis die Aktivierung der Th-Zellen erfolgt und detektierbar ist. Man kann davon ausgehen, dass der Wendepunkt in der Hochregulation zwischen den beiden gemessenen Inkubationszeiten von 10 und 22 h liegt. Jedoch kann für die CD69⁺ Th-Zellen bereits nach 10 h eine leichte Zunahme gemessen werden, was dem Charakter dieses frühen Aktivierungsmarkers entspricht.

Die Erprobung von Proteaseinhibitoren zur Steigerung der Detektierbarkeit verlief für alle drei verwendeten Inhibitoren (BFA, Bestatin und Aprotinin) letztendlich erfolglos (siehe Abb. 3.6 bis 3.9 in **3.1.6** bis **3.1.9**). Im Fall des BFA kann man aufgrund seiner vielfältigen Wirkung auf die Proteinbiosynthese davon ausgehen, dass dieses Reagenz alle synthetisierten Proteine zurückhält, die an die Zelloberfläche gelangen sollen [199]. Damit würde es auch eine erhöhte Exposition der gemessenen Aktivierungsmarker verhindern. Die kurze Inkubationsdauer von 4 h erklärt den relativ geringen und nur teilweisen Rückgang an aktivierungsantigenpositiven Th-Zellen in den durchgeführten Experimenten. Auch die Mittelwerte in den Ansätzen des Bestatins zeigen eher eine negative Auswirkung dieses Hemmstoffes für Metalloproteasen.

Dagegen ergeben die ersten Ergebnisse bei den Stimulationen in Anwesenheit des Inhibitors Aprotinin tendenziell einen positiven Effekt. Die Ursache für das Verschwinden dieses Effekts in den späteren teilweise nicht dargestellten Experimenten bleibt unklar.

Auch die Experimente, in denen Vollblutproben mit dem rekonstituierten Lyophylisat von *M. tuberculosis* stimuliert wurden, erbrachten keine erfolgreichen Ergebnisse (siehe Abb. 3.10 und 3.11 in **3.1.10**). Eine nachweisbare Hochregulation der Aktivierungsantigene zeigen hauptsächlich die Ansätze mit den in PBS gelösten Antigenen. Die Durchschnittswerte sind dem TT vergleichbar und es kann davon ausgegangen werden, dass die Th-Zellen überwiegend von den hydrophilen bakteriellen Proteinen stimuliert werden.

Die Rekonstitution des Lyophilisats in EtOH denaturiert hingegen diese hydrophilen Proteine, so dass man von einer Stimulation mit lipophilen Antigenen ausgehen kann. Die nur gering erhöhten Mittelwerte an lipidspezifischen antigenpositiven Th-Zellen lassen sich mit ihrer niedrigen Frequenz erklären. Dies deckt sich mit den publizierten Generierungen von lipidspezifischen T-Zellklonen [123; 346]: Erst ein kostimulatorisches Milieu oder eine wochenlange Inkubationszeit erbringt die gewünschten Zellen.

Mit DMSO, dem dritten verwendeten Lösungsmittel mit hydrophoben und -philen Eigenschaften, wurden Ergebnisse erhalten, die zwischen den beiden Extremen PBS und EtOH liegen und bestätigt die dargestellten Erklärungen. Der Vollblutansatz ist daher für die Detektion lipidreaktiver Th-Zellen nicht geeignet. Dazu kommt, dass eine Impfung gegen Tuberkulose nur einmal im Leben erfolgt, was wahrscheinlich zu dieser geringen Stimulationsantwort beiträgt.

Dagegen verdeutlicht der erfolgreiche Übergang vom Protein TT auf seine Peptide die Flexibilität des Stimulationsansatzes (siehe Abb. 3.12 in **3.1.11**). Das TT besitzt 1315 Aminosäuren und könnte nach seiner Degradierung in viele verschiedene Oligomeren theoretisch eine große Anzahl von spezifischen Th-Zellen stimulieren [90]. Eine Inkubation des Vollblutes mit den einzelnen Peptiden ermöglicht jedoch eine sehr genaue Identifizierung der stimulierenden Aminosäurenabfolge. Die beiden 20mer TTP1 und TTP2 stellen zwei Epitope dar, die unter 100 untersuchten Probanden bei 80 respektive 86 Personen die Th-Zellen stimulieren können [81]. Allerdings konnte für andere Peptide nur bei einem Teil der Probanden eine Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden [82].

Während das eingesetzte TTP1 ebenfalls zu einer Hochregulation der untersuchten Aktivierungsmarker führt, zeigt sich bei TTP2 meist nur eine geringe stimulierende Wirkung. Von den beiden übrigen Peptide TTP3 und TTP4 führt besonders TTP3 zur Hochregulation der Aktivierungsmarker auf den Th-Zellen. An T-Zellklonen konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Länge und die Enden die stimulatorischen Eigenschaften der Peptide beeinflusst, sondern auch nur bestimmte Aminosäurenabfolgen [311]. Man kann daher annehmen, dass von den vielen theoretisch präsentierten Epitopen des TT nur ein Bruchteil für die Immunreaktion verantwortlich ist. Statt einer Addition von Einzelreaktionen vieler Epitope in Form verschiedener Peptide, erscheint die Stimulation der Th-Zellen durch TT eine Addition vieler T-Zellen durch wenige Epitope respektive

Peptide. Der Befund, dass die Koinkubation von TT und seiner Peptide die Expression von CD134 und CD154 faktisch inhibiert kann nicht erklärt werden. Das weitere Vorgehen in der Peptidstimulation zeigt, dass für den vorhergehenden Versuchsblock zwar mit mehr als 24 h der richtige Inkubationszeitraum gewählt worden ist, jedoch eine Konzentration von 20 µg/ml zu niedrig ist (siehe Abb. 3.13 und 3.16 bis 3.19 in **3.1.12** und **3.2.3**). Der Grund für die relativ hohe optimale Peptidkonzentration von 40 µg/ml bleibt unbekannt. Denkbar wäre, dass in der Inkubationszeit von mehr als 24 h Degradationsvorgänge einen großen Teil der Peptidmoleküle zerstören. Dafür sprechen zwei Publikationen in der CMV-spezifische CTLs oder Th-Zellen in Vollblut oder Kulturmedium über 6 h mit einer geringeren Konzentration an CMV-Peptiden (jeweils 0,1 µg/ml) erfolgreich stimuliert werden [154; 279]. Jedoch ist die äquivalente Menge an Gesamthüllprotein des CMV mit 10 µg/ml höher als die eingesetzte Menge an TT (5 µg/ml). Auch ist es möglich, dass die Peptide mit Bestandteilen des Plasmas oder anderen Blutzellen interagieren und auf diese Weise nicht zu den APZs gelangen und in deren MHC-II eingebaut werden können.

Vergleicht man die Ergebnisse der gemessenen Aktivierungsantigene, so lassen diese folgende Schlussfolgerungen zu (siehe **3.1.1** bis **3.2.3**): Bei den gemessenen Zytokinen IFN- γ und IL-2 kommt es in den Th-Zellen infolge der Stimulation mit TT kaum zu einer erhöhten Expression. Ein Vergleich mit dem CMV-Lysat oder CMV-Peptiden als Stimulus zeigt, dass Th-Zellen generell Zytokine nach spezifischer Aktivierung exprimieren können [154; 366]. Sollte der Zeitpunkt der höchsten Expression zwischen 6 und 20 h liegen, wäre dies für einen Ansatz in der klinischen Routine unbrauchbar. Eine Zugabe des Inhibitors BFA für einen längeren Zeitraum als 4 h (beispielsweise über Nacht) ist aufgrund seiner Toxizität für die inkubierten Leukozyten problematisch.

Von den detektierten Aktivierungsantigenen erscheint CD25 als der sensitivste von allen untersuchten. Eine Hochregulation kann bei fast allen gemessenen Probanden mit den verschiedenen Stimuli beobachtet werden, wobei in den Versuchsreihen die Standardabweichungen für vier Personen zumeist akzeptabel sind. Andere Studien zeigen, dass die Expression von CD25 nach TT-Stimulation noch für Tage detektierbar ist [163].

Das Antigen CD69 erbringt im Vergleich mit CD25 zwar höhere Anteile an positiven Th-Zellen, jedoch zeigen die teilweise sehr hohen Standard-

abweichungen, dass eine Hochregulation nicht bei allen Probanden messbar ist. Umgekehrt kann auch bei einigen unstimulierten Kontrollansätzen bereits eine erkennbare antigenpositive Th-Zellsubpopulation identifiziert werden. Dazu kommen immer wieder CD69⁺ CTLs (beispielsweise in Abb. 3.1), weshalb für die Detektion GAD-spezifischer T-Zellen in **3.3** dieses Antigen aufgrund seiner unzureichenden Verlässlichkeit nicht verwendet wurde.

Die Messungen der Antigene CD71 und CD152 ergaben im Vergleich mit den anderen Aktivierungsmarkern meist eine geringere Sensitivität; daher wurde ihre Färbung und Detektion nach einigen Versuchen gestrichen.

Neben CD25 kann auch CD134 als ein sensibler Aktivierungsmarker gesehen werden. Die Mittelwerte an CD134⁺ Th-Zellen sind generell niedriger als die der CD25⁺ und auch die Standardabweichungen sind höher. Jedoch kann man bei diesem Antigen davon ausgehen, dass eher keine als eine unspezifische Hochregulation erfolgt. Vor allem die Tatsache, dass nach TT-Stimulation keine CD134⁺ CTLs gemessen werden, gibt diesem Aktivierungsmarker den Vorzug vor CD69.

Eine Detektion der Th-Zellstimulation über das Antigen CD154 hat den Vorteil, dass dieser Marker fast ausschließlich auf Th-Zellen exprimiert wird. Sein Nachteil besteht allerdings darin, dass ein großer Teil der aktivierten Th-Zellen CD154 exprimiert und intrazellulär speichert. Die Charakterisierung der Th-Zellen als CD154⁺ erfordert ihre vorherige Fixierung/Permeabilisierung und zeigt den deutlichen Vorteil der sequenziellen Färbung der Aktivierungsantigene gegenüber den übrigen Protokollen (siehe Abb. 3.6 in **3.1.6** und **1.2.5.3**).

Generell erscheint die Identifizierung der Th-Zellen über ihre Negativität gegenüber CD8 als sinnvoller, da eine Studie gezeigt hat, wie eine starke Stimulation dazu führt, dass CD4 herunterreguliert wird, und damit aktivierte Th-Zellen als CD4⁻ gemessen werden würden [323]. Dies kann auch für TT-aktivierte Th-Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Die Entwicklung des Stimulations- und Detektionsprotokolls mithilfe des TT und seiner Peptide ergibt eine Methode, die in kurzer Zeit und mit relativ wenig Aufwand durchführbar ist. Eine anschließende Überprüfung sollte klären, ob die detektierte Stimulation mit TT spezifisch erfolgt.

4.2 Spezifität der Stimulation

Die Anwendung des Stimulationsansatzes an den Blutproben ungeimpfter Spender und eine genauere Charakterisierung der aktivierten T-Zellen sollte klären, ob die Stimulation aufgrund des Antigens und nicht durch sog. Bystanderaktivierung erfolgt und ob die aktivierten T-Zellen Bestandteil des Immungedächtnisses sind gemäß der herrschenden Lehrmeinung (siehe **1.3**).

Eine Stimulation von Nabelschnurblut mit TT erbringt kaum stimulierte und antigenpositive T-Zellen (siehe Abb. 3.14 in **3.2.1**). Man kann daher annehmen, dass eine Hochregulation infolge der Aktivierung eine vorherige Auseinandersetzung mit dem Antigen verlangt. Eine frühere Studie detektiert eine Immunreaktion der PBLs bei Kindern im Alter von ca. 13 Monaten, die vorher (z. B. im 2. bis 4. Monat) geimpft worden waren [66]. Dazu kommt der Befund, dass im Nabelschnurblut fast ausschließlich naive T-Zellen vorhanden sind, die sich erst infolge von Immunisierungen respektive Infektionen zu Memory T-Zellen entwickeln (siehe Tab. 3.3 in **3.2.1**).

Bei erwachsenen Probanden zeigt die Charakterisierung der CD25⁺, CD134⁺ und CD154⁺ T-Zellen, dass die Antigene nach TT-Stimulation auf verschiedenen T-Zellsubpopulationen erhöht exprimiert werden (siehe Abb. 3.15 in **3.2.2**). Der große Teil der antigenpositiven T-Zellen rekrutiert sich aus der Population der Memory T-Zellen. Vor allem CD134 und CD154 wird fast nur auf den CD45R0⁺ T-Zellen hochreguliert. Dagegen erfolgt eine erhöhte Expression von CD25 auch auf naiven T-Zellen. Allerdings spielt die Einteilung der Memory und naiven T-Zellen mittels CD62L nur eine untergeordnete Rolle. Die Vorstellung, dass CD62L infolge der Stimulation abgespalten wird, kann in den Ergebnissen nicht bestätigt werden, da viele antigenpositive T-Zellen CD62L noch besitzen [103]. Generell jedoch steigt der prozentuale Anteil an CD62L⁺ T-Lymphozyten nach TT-Stimulation an (siehe Tab. 3.4 in **3.2.2**).

Die Identifizierung des Hauptanteils der aktivierten T-Zellen aus dem Memory Kompartiment entspricht der oben beschriebenen Vorstellung, dass die Immunantwort auf ein bekanntes Antigen von den CD45R0⁺ T-Lymphozyten getragen wird. Dabei kann man die Hochregulation von CD134 und CD154 auf der Oberfläche der T-Zellen zur Interaktion dieser mit den B-Zellen für die schnelle Bildung von Antikörpern verstehen. Die erhöhte Expression von CD25 auf naiven T-Zellen kann zum einen damit erklärt werden, dass in dieser Population innerhalb der kurzen Zeit eine Aktivierung stattfinden kann. Zum

anderen wird eine „Rückentwicklung“ von Memory zu naiven T-Zellen postuliert, die aber an ihrer Antigenpezifität nichts ändert [388].

Der Vergleich der TTP1-Stimulation mit dem gesamten Protein zeigt bezüglich der Aufteilung der verschiedenen Subpopulationen nur geringe Differenzen (siehe Tab. 3.5 in **3.2.3**). Offensichtlich sind die Auswirkungen einer Peptidstimulation auf die Zusammensetzung der T-Zellen geringer. Im Gegensatz zu TT erfolgt bei TTP1 keine Prozessierung in den APZs, da das Peptid direkt in den MHC-II eingebaut wird. Somit kann man ebenfalls annehmen, dass eine Kostimulation zwischen APZs und T-Zellen nur in reduzierter Form stattfinden kann [219; 226]. Eine Untersuchung dazu zeigt, dass antigenspezifische Memory T-Zellen für eine Stimulation gleicher Höhe weniger auf eine Kostimulation angewiesen sind als die naiven [69].

Trotz der direkten Beladung des MHC-II mit TTP1 und seiner wenigen Epitope können für die einzelnen Aktivierungsantigene in verschiedenen T-Zellsubpopulationen erhöhte Werte gemessen werden, die im Vergleich mit der TT-Stimulation niedriger sind (siehe Abb. 3.15 bis 3.19 in **3.2.2** und **3.2.3**). Generell sind für beide Stimuli die meisten aktivierten T-Zellen im Kompartiment der Memory T-Zellen zu detektieren. Dabei werden bei den CD62L⁻ Memory T-Zellen oftmals höhere Prozentwerte an Antigenpositiven gemessen. Innerhalb der naiven T-Zellen erfolgt eine Hochregulation der gemessenen Aktivierungsantigene (oftmals CD25 und CD69) bei beiden Stimuli fast nur innerhalb der CD62L⁺ Subpopulation. Im einzelnen konnte folgendes beobachtet werden:

Die CD25⁺ T-Zellen verteilen sich vor allem auf die CD62L⁺ Memory und naiven T-Zellen. Die Prozentwerte reichen mit 1,5 bis 3,0 % in etwa an die Mittelwerte der TT-stimulierten T-Zellen. Bei beiden Stimulationen ist unter den CD62L⁻ naiven T-Zellen keine Hochregulation zu beobachten. Auch bei der TTP1-Stimulation erweist sich CD25 als sensibler Aktivierungsmarker, wenngleich die Durchschnittswerte im Vergleich mit TT etwas zu hoch erscheinen.

An CD69⁺ T-Zellen können hauptsächlich CD62L⁻/CD45R0⁺ Vertreter identifiziert werden (ca. 2 % nach 24 h). Die Stimulation mit TTP1 ist mit diesem Antigen bereits nach 6 bis 8 h detektierbar, jedoch sind nach 24 h im Vergleich mit CD25 weniger T-Zellen als CD69⁺ messbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass CD69 bereits wieder herunterreguliert wird, und damit der Anteil der positiven T-Zellen schrumpft. Eine Studie an CTLs zeigt, dass auch bei diesen T-Zellen eine Hochregulation von CD25 und CD69 im naiven und Memory-Kompartiment nach

Peptidstimulation detektierbar ist [426]. Der Vergleich der CD69-Expression nach Stimulation von Vollblut mit dem Lysat des CMV oder mit einzelnen Peptiden (15mere) in einer weiteren Studie zeigt nach 24 h innerhalb der Th-Zellen deutlich höhere Prozentwerte bei den lysatstimulierten Ansätzen [242]. Eine Hochregulation von CD134 infolge der Stimulation mit TTP1 ist wie mit TT nur bei den Memory T-Zellen zu messen. Die Mittelwerte des Peptids sind aber deutlich niedriger als die des gesamten Proteins. Das TT führt auch bei einigen naiven T-Zellen zu einem leichten Anstieg an CD134⁺ Zellen.

Deutlicher sind die Differenzen zwischen der Stimulation mit TT und TTP1 beim Aktivierungsantigen CD154: Können infolge der TT-Stimulation 1 bis 2 % positive Memory T-Zellen detektiert werden, so führt die Inkubation mit TTP1 zu keinem messbaren Anstieg der CD154⁺ T-Zellen in allen vier Subpopulationen. Offensichtlich reicht eine Peptidstimulation nicht aus, um die Expression von CD154 zu erhöhen.

Die Detektion antigenspezifischer T-Zellen ist außer über ihre Aktivierungsantigene infolge Stimulation auch mit der Färbung durch peptidbeladene HLA-Tetramere möglich. Die erfolgte mehrmalige Erprobung von pp65-beladenen HLA-A2-Tetrameren zur Identifizierung CMV-spezifischer T-Zellen ohne ihre Aktivierung demonstriert ihre alternative Verwendbarkeit (siehe Abb. 3.20 in **3.2.4**).

Der Vergleich der fünf Probanden (ein CMV-seronegativer und vier CMV-seropositiver) zeigt für die seropositiven nahezu eine Halbierung der CTLs in CD57⁺ und CD57⁻. Der Befund, dass so gut wie keine CD57⁺ CTLs beim seronegativen Probanden Nr. 3 gemessen werden können, legen nahe, dass keine chronischen Infektionen mit CMV erfolgt sind. Allerdings können pro µl Vollblut insgesamt 5 CTLs detektiert werden, die Tetramer⁺ sind. Generell jedoch ist die Gesamtzahl der Tetramer⁺ CTLs bei den vier seropositiven Probanden immer höher (6 – 15). Die unspezifische Bindung der Tetrameren beim seronegativen Probanden kann damit erklärt werden, dass diese auch mit CTLs interagieren können, die spezifisch für ein dem pp65 ähnliches Peptid sind. Eine andere Untersuchung erbringt unter seropositiven und gesunden Probanden Werte von 0,1 bis 50 Tetramer⁺ CTLs pro µl Vollblut, während unter den seronegativen Kontrollpersonen weitgehend Tetramer⁻ CTLs detektiert werden [130].

Ein abschließender Vergleich des etablierten Stimulationsprotokolls mit anderen Methodiken zur Detektion aktivierter antigenspezifischer T-Lymphozyten zeigt die

deutlichen Vorteile: Im Gegensatz zu den beschriebenen HLA-Tetrameren, werden mit den antigenpositiven T-Zellen tatsächlich aktivierte und nicht potenziell aktivierbare identifiziert. Darüber hinaus muss für die Anwendung der HLA-Tetrameren der HLA-Typ des Probanden und das erkannte Peptid bekannt sein, was beim Stimulationsprotokoll entfallen kann [10].

Auch die verschiedenen Protokolle zur Detektion einer Proliferation der T-Zellen nach Aktivierung mit fluoreszenten oder radioaktiven Substanzen benötigen einen vergleichsweise höheren Einsatz an Materialien und Aufwand. Sie sind wesentlich unempfindlicher und ermöglichen teilweise keine weitere Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen [13; 76; 154]. Die Detektion einer Aktivierung mittels ELISPOT hat ebenfalls mehr Nachteile, da die T-Zellen vorher separiert werden müssen und die Auswertung deutlich mehr Zeit benötigt [72].

Aus den genannten Gründen wurden die GAD-spezifischen T-Zellen in der folgenden Pilotstudie mit dem Stimulationsprotokoll über ihre Antigenexpression nach Aktivierung mit GAD-Peptiden detektiert.

4.3 GAD-Reaktivität

Mit dem Übergang von Peptiden des TT auf die der GAD konnte demonstriert werden, dass der etablierte Stimulationsansatz auch für die Identifizierung von autoantigenspezifischen T-Zellen geeignet ist. Nach einer erfolgreichen Austestung verschiedener Stimulationszeiträumen, wurde auch für diese Aufgabenstellung die Spezifität der Stimulation überprüft.

Die Ergebnisse zeigen für die drei zuerst untersuchten Aktivierungsantigene CD25, IFN- γ und IL-10 teilweise deutlich abgegrenzte Hochregulationen (siehe Abb. 3.21 bis 3.26 in **3.3.1**). Zwar werden die T-Zellen nicht direkt über CD3 identifiziert, jedoch beträgt der Anteil innerhalb der abgegrenzten Lymphozyten ca. 70 %. Jedoch können einige Ergebnisse nach der Wiederaufnahme der Färbung der T-Lymphozyten nicht wiederholt werden (siehe Abb. 3.27 bis 3.29 in **3.3.2**). Dies kann damit erklärt werden, dass offenbar unter den Lymphozyten auch andere stimulierte Zelltypen (z. B. NK-Zellen) gemessen und analysiert werden.

Die Inkubation mit den GAD-Peptiden bewirkt vor allem auf den CD4⁺ Lymphozyten eine Hochregulation von CD25. Dies deckt sich mit den vorherigen Stimulationen mit TTP1, die hauptsächlich bei Th-Zellen detektiert wurde. Eine

Aktivierung von GAD-spezifischen CD4⁺ CTLs, die ebenfalls beschrieben worden sind, kann anhand von CD25 nur in geringen Umfang nachgewiesen werden [297]. Darüber hinaus kann diese Antwort auf CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Lymphozyten gemessen werden. Die eindeutige Identifizierung der T-Zellen bestätigt die Hochregulation von CD25 bei naiven und Memory T-Zellen infolge der Stimulation mit GAD-Peptiden. Die hohen Werte an CD25⁺ Zellen werden in den nachfolgenden Messreihen nicht mehr gemessen, was darauf hindeutet, dass diese Peptide andere Leukozyten stark stimuliert hat. Die beiden Kontrollpeptide TTP1 und NCP erbringen die gewünschten Mittelwerte infolge einer Stimulation oder Nichtstimulation, wobei TTP1 nach einem und nach drei Tagen ähnliche Durchschnittswerte erbringt (vergleiche **3.3.1** mit **3.2.3**). Der Vergleich der beiden Messreihen zeigt für CD25 und für die übrigen Aktivierungsmarker, dass auf eine Färbung der T-Zellen mit Anti-CD3 nicht verzichtet werden kann.

Die Messung der Expression von IFN- γ erbringt in der ersten Messreihe bei allen vier Lymphozytenpopulationen (CD4⁺ und CD45RA⁺) für GP04 und GP08 ein deutliches Signal. Diese dem CD25 analoge Hochregulation verschwindet infolge der eindeutigen Identifizierung der T-Lymphozyten, was vermutlich daran liegt, dass auch IFN- γ von anderen Leukozyten sehr stark hochreguliert werden kann. Die Werte für NCP lassen vor allem am vierten Tag eine spezifische Stimulation und Expression von IFN- γ zweifelhaft erscheinen.

Die Substitution von IL-10 durch CD134 macht aufgrund der Ergebnisse Sinn. Das Zusammentreten von IL-10⁺ und CD4⁺ respektive CD45RA⁺ Lymphozyten im Vergleich mit den negativen Populationen erheben den Verdacht einer unspezifischen Bindung des Antikörpers. Darüber hinaus erscheinen die Mittelwerte von IL-10 mit Blick auf den NCP-Ansatz eher zufälliger Natur. Die Messung von CD134 detektiert ein Antigen, das infolge der Peptidstimulation nicht sehr deutlich und fast nur bei Memory T-Zellen hochreguliert wird; allerdings kann hier eher von einer spezifischen Stimulation ausgegangen werden. Auch bei CD134 werden nach drei Tagen TTP1-Stimulation nicht wesentlich mehr positive T-Lymphozyten (ca. 1 %) detektiert als nach einem Tag (vergleiche **3.3.2** und **3.2.3**).

Die Eingrenzung auf zwei Aktivierungsmarker und die Einteilung der T-Zellen in naive und Memory Subpopulation ermöglicht in Verbindung mit der durchgeführten Bestimmung des HLA-Typs eine weitgehend vollständige Beurteilung der Spezifität der Stimulation (siehe Tab. 3.6 bis 3.12 in **3.3.3**). Allerdings kann

nicht ausgeschlossen werden, dass die Peptide an weitere als den angegebenen HLA-Typen binden können [248].

Für die beiden Kontrollpeptide liegen die Einzelwerte in den erwarteten Bereichen: Das TTP1 bindet wie einige andere TT-Peptide an verschiedene HLA-Typen, weshalb der Einsatz als Kontrolle der Stimulierbarkeit gerechtfertigt ist [82; 298]. Bei sieben der acht Probanden kann die Stimulation anhand der Hochregulation von CD25 und nur bei einem Probanden anhand CD134⁺ T-Zellen detektiert werden, was den bisherigen Erfahrungen entspricht. Die Einzelwerte der NCP-Inkubation liegen teilweise nahe der Positivgrenze von 0,8 %. Offensichtlich steigt nach drei Tagen Inkubation auch die unspezifische Hochregulation der Antigene, was einen längeren Zeitrahmen verbietet.

Auffällig ist, dass der Großteil an nicht erwarteten aktivierten T-Zellen bei beiden Personengruppen für das GP01 ermittelt wurden. Möglicherweise wird GP01 von weiteren HLA-Typen präsentiert, oder es hat eine ähnliche Sequenz wie das Peptid eines häufigen Antigens. Im Fall einer Routineanwendung sollte dieses Peptid nicht herangezogen werden.

Die Ergebnisse des GP02 müssen vor dem Hintergrund eines Sequenzfehlers gesehen werden. Die in **7** rot markierte Aminosäure liegt jedoch nahe am Anfang des Peptids und stellt mit Isoleucin statt Leucin keine deutliche Abweichung von der Originalsequenz der GAD dar. Ein Einfluss auf die Stimulationsfähigkeit des Peptids kann nur schwer eingeschätzt werden. In einer anderen Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sequenz der GAD-Peptide für ihre Stimulationspotenz wichtig ist [160].

Die Inkubation mit den übrigen GAD-Peptiden GP03 bis GP11 erbringt mit 16 HLA-kompatiblen und erfolgten und sieben nicht HLA-kompatiblen aber erfolgten Hochregulationen von CD25 und/oder CD134 überwiegend korrekte Stimulationen. Ganz eindeutig überwiegt jedoch die Zahl der mit den HLA-Allelen kompatiblen aber nicht erfolgten Stimulationen vor allem innerhalb der CD134⁺ T-Zellen. Eine Erklärung für den Befund, dass innerhalb der Kontrollpersonen die meisten nicht erwarteten aber erfolgten Antworten bei den Memory T-Zellen und bei den Patienten unter den naiven T-Zellen gemessen werden, kann nicht gegeben werden.

Der Vergleich mit den Publikationen anderer Arbeitsgruppen erbringt auch bei diesen eine Stimulierbarkeit von Leukozyten der Patienten und Kontrollpersonen mit den Peptiden der GAD. Allerdings erfolgt in diesen Arbeiten entweder eine

Generierung peptidspezifischer T-Zelllinien oder eine Detektion der Aktivierung mittels Proliferationsansatz. In beiden Fällen werden die PBMCs oder T-Zellen wesentlich länger inkubiert als drei Tage und teilweise mit Zytokinen kostimuliert, was die Vergleichbarkeit mit dem vorgestellten Vollblutansatz nahezu unmöglich macht [94; 95; 369].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Stimulationsansatz geeignet ist, GAD-reaktive T-Zellen in Vollblut zu detektieren. Der Umstand, dass sowohl bei Diabetes-Patienten als auch bei gesunden Probanden GAD-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden können, beweist, dass ihre reine Anwesenheit nicht ursächlich für den Diabetes Typ I ist. Weitere Hinweise auf die tatsächliche Ursache für die Induktion dieser Erkrankung (Kostimulation und Expansion der GAD-spezifischen T-Zellen über eine kritische Grenze, gestörte Eliminierung aktivierter T-Zellen, etc.) geben die erhaltenen Ergebnisse allerdings nicht.

4.4 Apoptoseinduktionsansatz

Aufgrund der unbefriedigenden Resultate mit der Identifizierung autoantigen-spezifischer T-Zellen über den Stimulationsansatz wurde ein anderer experimenteller Zugang erstellt. In den Versuchsreihen wurde getestet, ob sich an T-Lymphozyten aus dem Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen Unterschiede im Apoptoseverhalten nachweisen lassen.

Die Austestung verschiedener Reagenzien zur Induktion der Apoptose zeigt deutlich, dass nur ein Teil der verwendeten Chemikalien für Ansätze mit separierten PBLs funktioniert (siehe Abb. 3.30 und 3.31 in **3.4.1** und **3.4.2**).

Bereits die alleinige Zugabe des Lösungsmittels DMSO in Verbindung mit der spontanen Apoptose führt zu einem Anteil Annexin V⁺ T-Zellen, der bei einigen induzierten Ansätzen nicht erhalten wird. Das DMSO wirkt in höheren Konzentrationen zytotoxisch, weshalb bei einer Inkubationsdauer von bis zu drei Tagen versucht wurde, die eingesetzte Menge zu minimieren [391]. Trotzdem werden Mittelwerte von bis zu 10 % Annexin V⁺ T-Zellen erreicht. Aufgrund der Anpassung der Inkubationen kann das DMSO in späteren Messreihen durch Wasser respektive PBS ersetzt werden, was einen geringeren Anteil an apoptotischen T-Zellen in den Kontrollansätzen zur Folge hat (siehe Abb. 3.34 und 3.35 in **3.4.2**).

Eine Induktion der Apoptose mittels Staurosporin gelingt mit der publizierten Konzentration nicht [162]. Die Mittelwerte an PS-exponierenden T-Lymphozyten

liegen lediglich im Bereich der DMSO-Ansätze. Eine mögliche Erklärung ist, dass in den angesetzten Kulturen im Gegensatz zur Veröffentlichung auch Granulozyten vorhanden sind, die die Wirkung des Reagenz beeinträchtigen könnten.

Ähnliches gilt für die Induktion der Apoptose durch Methotrexat in PMA/Ionomycin-aktivierten T-Zellen: Die hohen Werte an detektierten apoptotischen PBLs in der Veröffentlichung von L. Genestier et al. können mit dem ursprünglichen und einem modifizierten Protokoll nicht erhalten werden [120]. Aufgrund seiner relativ umständlichen Methodik erscheint diese Vorgehensweise zur Generierung apoptotischer T-Lymphozyten ohnehin eher ungeeignet.

Eine Inkubation der separierten PBLs mit 2-Chloradenosin erbringt innerhalb der drei Inkubationstage im Vergleich zum DMSO-Ansatz mehr Annexin V⁺ T-Lymphozyten, jedoch sind die Mittelwerte von unter 5 % zu niedrig. Die Vorgabe einer deutlich messbaren apoptotischen T-Zellsubpopulation kann mit diesem Ansatz nicht erreicht werden. Das Originalprotokoll verwendet PBLs ohne Granulozyten und erhält mit 20 bis 50 % deutlich mehr apoptotische Leukozyten [28]. Wie bei den vorherigen Ansätzen kann man eine negative Auswirkung der Granulozyten auf die apoptotische Potenz des 2-Chloradenosins vermuten.

Die gleiche Publikation von D. Barbieri et al. verwendet auch 2-Chloro-2'-deoxyadenosin, das im Gegensatz zu 2-Chloradenosin bereits nach einem Tag erfolgreich apoptotische T-Zellen generieren kann. Zwar sind die erhaltenen Mittelwerte von 20 - 40 % an Annexin V⁺ T-Zellen geringer als die der Veröffentlichung, jedoch genügt dies für das Ziel einer stabil generierten T-Zellsubpopulation [28]. Der Nachteil des 2-Chloro-2'-deoxyadenosins ist, dass es bereits nach zwei Tagen zu einer starken Abnahme detektierbarer T-Lymphozyten führt. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgende Reihenuntersuchung das Reagenz 2-Deoxy-D-ribose gewählt.

Der Einsatz von 2-Deoxy-D-ribose zur Generierung apoptotischer T-Zellen erbringt nach zwei Tagen einen relativ konstanten Anteil von ca. 30 % Annexin V⁺/CD3⁺ Zellen (siehe Abb. 3.30, 3.31 und 3.34 in **3.4.1**, **3.4.2** und **3.4.3**). Ein Vergleich mit den Ergebnissen einer anderen Studie zeigt, dass diese Werte in einem realistischen Bereich liegen, auch wenn die Detektion der apoptotischen T-Zellen auf andere Weise erfolgt [264]. Ein weiteres gewichtiges Argument für 2-Deoxy-D-ribose als Induktor ergibt sich aus dem Befund, dass

die Apoptose über oxidativen Stress ausgelöst wird [200]. Dieser oxidative Stress wiederum verhindert die Phagozytose der apoptotischen Leukozyten durch Makrophagen [12]. Damit kann angenommen werden, dass eine Verfälschung der Werte über die normalerweise stattfindende Entfernung PS-exponierender T-Zellen weitgehend verhindert wird (siehe **1.4.5**).

Die vergleichende Induktion der Apoptose in den PBLs von Kontrollpersonen, SLE- und Sjögren-Patienten ergibt für die T-Zellen der Autoimmunpatienten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem oxidativen Stress (siehe Abb. 3.31 und 3.34 in **3.4.2** und **3.4.3**). Dies deckt sich mit einer Publikation in der die Apoptose über H₂O₂ induziert wird [121]. Bereits nach 16 h Inkubation ist der Anteil nekrotischer T-Lymphozyten bei den gemessenen Proben von SLE-Patienten doppelt so hoch wie bei den parallel angesetzten Proben von Kontrollpersonen oder RA-Patienten. Umgekehrt kann bei SLE-Patienten der von A. Perniok et al. publizierte erhöhte Anteil Annexin V⁺ T-Lymphozyten (ca. 12 %) bei separierten und unbehandelten PBLs nicht bestätigt werden [301]. Der Grund für diesen hohen Mittelwert wird darin gesehen, dass die T-Zellen protokollbedingt mit Ficoll in Kontakt kommen, was bei den Proben der SLE-Patienten die Apoptose induziert.

Die ebenfalls durchgeführte Messung der intrazellulären Expression von Bcl-2 erbringt auch für dieses antiapoptotische Protein erhöhte Werte bei SLE- und Sjögren-Patienten im Vergleich mit den gesunden Probanden (siehe Abb. 3.31 und 3.34 in **3.4.2** und **3.4.3**). Die ursprünglich beschriebene gleiche Bcl-2-Expression bei unbehandelten Leukozyten von SLE-Patienten und gesunden Probanden wurde bereits später berichtigt [129; 320]. Auch bei unbehandelten T-Lymphozyten von Patienten mit Sjögren's Syndrom ist eine erhöhte Expression von Bcl-2 beschrieben, was sich prinzipiell mit den erhaltenen Ergebnissen deckt (siehe Abb. 3.34 und [283]). Die Inkubation der T-Zellen über einen oder zwei Tage mit dem Lösungsmittel oder den Apoptoseinduktoren bewirkt bei einem Großteil der T-Zellen eine Expression von Bcl-2 mit der Folge einer Annäherung der Mittelwerte der verschiedenen Probanden. Daher ist der Aussagewert dieser Messungen eher geringer einzustufen als die Messung mit Annexin V.

Eine weitere Charakterisierung der apoptotischen T-Zellen erbringt mit der Detektion verschiedener Ceramide an der Oberfläche keine stabilen Signale unabhängig von Inkubation oder Proband (siehe Abb. 3.32 und 3.33 in **3.4.2**).

Dagegen zeigt die Messung des Protonengradienten über der Mitochondrienmembran mittels JC-1 einen deutlichen Anstieg der grünen Fluoreszenz dieses Farbstoffs infolge der Inkubation mit 2-Deoxy-D-ribose bei allen Proben (siehe Abb. 3.34 in **3.4.3** und [334]). Jedoch erscheinen die Mittelwerte der unbehandelten T-Zellen relativ hoch und zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit Sjögren's Syndrom kann nur eine leichte Zunahme gemessen werden. Diese Zunahme ist auch für SLE-Patienten beschrieben worden [121].

Eine Induktion des programmierten Zelltods mittels CD95-Antikörper erbringt im Vergleich mit den Chemikalien nur eine geringe Anzahl an Annexin V⁺ T-Zellen (siehe Abb. 3.35 in **3.4.4** und [338]). Aufgrund dessen sind alle Aussagen relativ zu sehen. Der Vergleich der Probandengruppen zeigt trotzdem, dass nach einem Tag Antikörpergabe etwas mehr apoptotische T-Zellen bei den Autoimmunpatienten gemessen werden kann. Dies ist für SLE- und Sjögren-Patienten beschrieben [38; 423]. Allerdings ist die Gruppe der SLE-Patienten mit nur zwei Personen für verlässliche Aussagen zu klein.

Die Messung von Bcl-2 erbringt auch bei der Induktion über Anti-CD95 für die Patienten höhere Durchschnittswerte. Jedoch zeigt sich, dass die Expression relativ unabhängig von der Gabe des Antikörpers ist, was sich wiederum mit den geringen Werten Annexin V⁺ T-Zellen deckt (siehe Abb. 3.35 und 3.37 in **3.4.4**). Für die Messung der Vitalität der T-Zellen durch JC-1 gelten die gleichen Schlussfolgerungen.

Bei den Ergebnissen der gemessenen Ceramide CDw17, CD65s und CD77 kann nur für die CD77-Exposition ein Anstieg infolge der Antikörpergabe gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem programmierten Zelltod und diesen Ceramiden ist bisher nur für CD77 auf B-Zellen beschrieben [244].

Die verschiedenen Apoptose-Induktionsansätze erbringen vor allem bei der Detektion von PS an der Oberfläche der T-Zellen messbare Unterschiede. Dabei zeigt sich, dass die Bereitschaft der T-Lymphozyten in Apoptose zu gehen in Kombination mit einer Autoimmunerkrankung messbar erhöht ist. Dies bestätigen die anderen untersuchten Apoptoseparameter bei geringeren Differenzen.

4.5 CD1-relevante Leukozyten

Gleichzeitig zu den Untersuchungen zum Apoptoseverhalten der T-Zellen wurden in den gemessenen Proben Leukozyten detektiert, die entweder auf CD1d reaktiv sind, oder dieses Antigen an der Oberfläche exprimieren.

Die erhaltenen prozentualen Mittelwerte an CD1d-reaktiven NK-T-Zellen im Vollblut von gesunden und erkrankten Probanden zeigen aufgrund ihrer geringen Anzahl kaum Unterschiede (siehe Tab. 3.13 in **3.5.1**). Eine genauere Untersuchung von S. Kojo et al. ergibt für 1 ml Vollblut eine Zellzahl von etwa 300 NK-T-Zellen bei gesunden Probanden und etwa 50 bei SLE- oder RA-Patienten [203]. Mit einer durchschnittlichen Lymphozytenzahl von 3 Millionen pro ml Vollblut errechnen sich aus den gemessenen Prozentwerten für die gesunden Probanden 1.500, für die RA-Patienten 600 und für die SLE-Patienten 1.200 NK-T-Zellen. Dieser Vergleich zeigt den verfälschenden Einfluss des Debris bei seltenen Signalen während der Messung.

Auch die Bestimmung der Absolutzahlen von CD1c⁺ und CD1d⁺ DCs erbringt für die Autoimmunpatienten niedrigere Mittelwerte (siehe Abb. 3.38 in **3.5.2**). Die etwa gleich hohen Werte für CD1c⁺ und CD1d⁺ DCs konnten in einer späteren Messreihe damit erklärt werden, dass die DCs entweder beide Antigene oder keines exprimieren (Daten nicht gezeigt). Eine Publikation von Y. Ozaki et al. bestätigt die gemessenen Unterschiede von Kontrollpersonen und Patienten mit Sjögren's Syndrom. Sowohl bei allen DCs als auch bei den CD1c⁺ DCs sind die Werte der Patienten niedriger (10.810 und 3.300 pro ml Vollblut) gegenüber den gesunden Probanden (19.173 und 10.777 pro ml Vollblut), was sich teilweise mit den eigenen Ergebnissen gut deckt (vergleiche [292] und Abb. 3.38).

Eine Beteiligung von NK-T-Zellen und CD1⁺ DCs an der Pathogenese der untersuchten Autoimmunerkrankungen wird für möglich gehalten, jedoch ist nicht geklärt ob die jeweils reduzierte Absolutzahl damit im Zusammenhang steht. Hier sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

5 Zusammenfassung

Autoimmunerkrankungen stellen im Wechselspiel von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen eine antigenspezifische Störung der T-Zellaktivierung bei einer gleichzeitigen Abweichung der Modulation des Überlebens der T-Zellen im Rahmen der Apoptoseregulation dar. Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Identifizierung und Charakterisierung antigenspezifischer T-Zellen mithilfe eines Vollblutstimulationsansatzes. Darüber hinaus wurden Unterschiede zwischen gesunden Personen und Autoimmunpatienten bezüglich der Apoptose ihrer peripheren T-Lymphozyten und der Frequenz ihrer CD1-reaktiven respektive ihrer CD1-exprimierenden Leukozyten untersucht.

Es konnte ein Modellsystem etabliert werden, bei dem in Vollblut die Aktivierung der T-Lymphozyten durch den Stimulus Tetanustoxoid (TT) über die Hochregulation von bestimmten Aktivierungsantigenen im Durchflusszytometer gemessen wird. Die Optimierung der Versuchsparameter (Lithium-Heparin als Antikoagulanzen, Verdünnung mit 66 % Medium, Zellernte ohne EDTA, Inkubation für mindestens 22 h) und der Detektion dieser TT-aktivierten T-Zellen (sequenzielle Färbung der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD134 und CD154) ergab mit 1 bis 3 % positiver T-Lymphozyten eine spezifische und reproduzierbare Antwort in Form einer abgesetzten Subpopulation. Eine vergleichende Inhibierung der Sekretion bzw. Degradation mit den Reagenzien Brefeldin A, Bestatin oder Aprotinin führte zu keiner Steigerung in der Detektion der Antigenexpression.

Dagegen konnten bereits mit einzelnen Peptiden des TT ohne zusätzliche Kostimulation aktivierte T-Zellen gemessen werden. Die Parameter dieser Peptidstimulation wurden ebenfalls ausgetestet und optimiert (40 µg/ml Peptidkonzentration, mindestens 24 h Inkubation).

Eine weitergehende Charakterisierung der vom TT oder seinem Peptid aktivierten T-Lymphozyten erbrachte für diese hauptsächlich den Memory-Phänotyp und bestätigte die Vorstellung einer vom Immungedächtnis getragenen Reaktion. Dies demonstrierte auch die Austestung des Ansatzes an Vollblutproben ungeimpfter Probanden (Nabelschnurblut) in Form eines Mangels an aktivierungsantigenpositiven T-Zellen.

Nach der Etablierung des Vollblutansatzes zur Detektion TT-spezifischer T-Zellen erfolgte seine Anwendung als einfache und schnelle Methodik zur Identifizierung Glutaminsäuredecarboxylase (GAD)-reaktiver T-Lymphozyten für einen möglichen Einsatz in der klinischen Routine. Den GAD-spezifischen T-Zellen wird eine entscheidende Rolle an der Induktion und Exekution der Diabetes Typ I-verursachenden Autoimmunreaktion gegen die GAD- und Insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zugewiesen. Die Identifikation aktivierter T-Zellen (0,5 – 1,5 %) gelang über den Stimulationsansatz mit den einzelnen GAD-Peptiden bereits nach 72 h Inkubation. Eine nachfolgende Pilotstudie mit den Blutproben von gesunden Probanden und Diabetes Typ I-Patienten zeigte zum einen, dass unter den aktivierten T-Zellen der Anteil CD25-exprimierender T-Zellen überwog, während mit dem Antigen CD134 nur geringe Stimulationen festgestellt werden konnten. Andererseits gelang der Nachweis von GAD-reaktiven T-Zellen im Vollblut beider Gruppen unabhängig vom Diabetes mellitus Typ I, was sich mit den Ergebnissen weiterer Arbeitsgruppen deckt.

Die Induktion der Apoptose (z. B. über CD95) in T-Zellen ist ein regulatorischer Gegenpart zur Begrenzung ihrer Aktivierung. Mithilfe eines etablierten Ansatzes zur Induktion der Apoptose in T-Lymphozyten wurde untersucht, ob bei Autoimmunerkrankungen eine Störung nachweisbar ist. Die Inkubation mit 2-Deoxy-D-ribose erwies sich dabei als optimal (1,34 mg/ml Konzentration, Inkubation für 48 h), und es konnte demonstriert werden, dass die Apoptose in T-Zellen von Patienten mit Sjögren's Syndrom oder SLE im Vergleich mit gesunden Probanden leichter induziert werden kann. Diese Differenzen zwischen den Probandengruppen konnten auch über einen CD95-Antikörper als Apoptose-induktor in geringerem Ausmaß analog publizierter Daten gefunden werden.

Parallel erfolgte für die untersuchten Blutproben der Autoimmunpatienten eine Charakterisierung der CD1-exprimierenden und CD1-reaktiven Leukozyten. Die Moleküle des CD1-Systems präsentieren den T-Zellen degradierte und lipophile Antigene, wobei beladenes CD1d die spezielle Subpopulation der NK-T-Zellen stimuliert. Für diese NK-T-Zellen wurden bei gesunden und erkrankten Probanden gemäß einer publizierten Absolutzählung nur geringe Frequenzen im Vollblut gemessen. Dagegen konnten in Konvergenz mit anderen Arbeiten bei

allen Autoimmunpatienten reduzierte Zellzahlen an CD1c⁺ und CD1d⁺ Dendritischen Zellen bestimmt werden.

Sowohl die funktionelle Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen und der T-Zell-Apoptose wie auch die Phänotypisierung CD1-relevanter Leukozyten konnten erfolgreich etabliert werden. Dabei wurden teilweise deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt, was darauf hinweist, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden für eine klinische Studie zur Analyse der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen geeignet sind.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **Ahmed, S., Ihara, K., Kanemitsu, S., Nakashima, H., Otsuka, T., Tsuzaka, K., Takeuchi, T., and Hara, T.** (2001): Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population.
Rheumatology: **40**, (6) 662-667.

- [2] **Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C., and Janossy, G.** (1988): Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells.
The Journal of Immunology: **140**, (7) 2171-2178.

- [3] **Al-Alwan, M. M., Rowden, G., Lee, T. D., and West, K. A.** (2001): Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells.
The Journal of Immunology: **166**, (1) 338-345.

- [4] **Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N.** (1998): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine: **188**, (7) 1359-1368.

- [5] **Alderson, M. R., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K. A., Goodwin, R. G., Smith, C. A., Ramsdell, F., and Lynch, D. H.** (1995): Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine: **181**, (1) 71-77.

- [6] **Alexander, D. R.** (2000): The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.
Seminars in Immunology: **12**, (4) 349-359.

- [7] **Almeida, J., Bueno, C., Alguero, M. C., Sanchez, M. L., Canizo, M. C., Fernandez, M. E., Vaquero, J. M., Laso, F. J., Escribano, L., San Miguel, J. F., and Orfao, A.** (1999): Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells.
Clinical and Experimental Immunology: **118**, (3) 392-401.
- [8] **Altman, J. D., McHeyzer-Williams, M. G., Michael, G., and Davis, M. M.** (1997): Compositions and methods for the detection, quantitation and purification of antigen-specific T cells.
Patent No. US5635363, 1-18.
- [9] **Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M.** (1996): Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.
Science: **274**, (5284) 94-96.
- [10] **Altman, J. D., Reay, P. A., and Davis, M. M.** (1993): Formation of functional peptide complexes of class II major histocompatibility complex proteins from subunits produced in *Escherichia coli*.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **90**, (21) 10330-10334.
- [11] **Andersen, O., Lygner, P. E., Bergstrom, T., Andersson, M., and Vahlgren, A.** (1993): Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study.
Journal of Neurology: **240**, (7) 417-422.
- [12] **Anderson, H. A., Englert, R., Gursel, I., and Shacter, E.** (2002): Oxidative stress inhibits the phagocytosis of apoptotic cells that have externalized phosphatidylserine.
Cell Death and Differentiation: **9**, (6) 616-625.

- [13] **Andreeff, M., Darzynkiewicz, Z., Sharpless, T. K., Clarkson, B. D., and Melamed, M. R.** (1980): Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood*: **55**, (2) 282-293.
- [14] **Angenieux, C., Salamero, J., Fricker, D., Cazenave, J. P., Goud, B., Hanau, D., and de La Salle, H.** (2000): Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry*: **275**, (48) 37757-37764.
- [15] **Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G., and Cyster, J. G.** (1999): In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of Experimental Medicine*: **190**, (8) 1123-1134.
- [16] **Antia, R., Pilyugin, S. S., and Ahmed, R.** (1998): Models of immune memory: on the role of cross-reactive stimulation, competition, and homeostasis in maintaining immune memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **95**, (25) 14926-14931.
- [17] **Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., McShane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., Healey, L. A., Kaplan, S. R., Liang, M. H., and Luthra, H. S.** (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*: **31**, (3) 315-324.
- [18] **Ashmun, R. A. and Look, A. T.** (1990): Metalloprotease activity of CD13/aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells. *Blood*: **75**, (2) 462-469.
- [19] **Asimakopoulos, G., Taylor, K. M., Haskard, D. O., and Landis, R. C.** (2000): Inhibition of neutrophil L-selectin shedding: a potential

anti-inflammatory effect of aprotinin.

Perfusion: **15**, (6) 495-499.

- [20] **Atkinson, M. A., Bowman, M. A., Campbell, L., Darrow, B. L., Kaufman, D. L., and Maclaren, N. K.** (1994): Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes.
The Journal of Clinical Investigation: **94**, (5) 2125-2129.
- [21] **Atkinson, M. A., Kaufman, D. L., Campbell, L., Gibbs, K. A., Shah, S. C., Bu, D. F., Erlander, M. G., Tobin, A. J., and Maclaren, N. K.** (1992): Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes.
Lancet: **339**, (8791) 458-459.
- [22] **Baekkeskov, S., Aanstoot, H. J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., De Camilli, P., and Camilli, P. D.** (1990): Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.
Nature: **347**, (6289) 151-156.
- [23] **BAG** (2002): *Histo Tray DR 72 Worksheet*.
1-2. Biologische Analysensystem GmbH, Lich.
- [24] **Balasa, B., Krah, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H. O., and Sarvetnick, N.** (1997): CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice.
The Journal of Immunology: **159**, (9) 4620-4627.
- [25] **Balk, S. P., Bleicher, P. A., and Terhorst, C.** (1991): Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1.
The Journal of Immunology: **146**, (2) 768-774.

- [26] **Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K.** (2000): Immunobiology of dendritic cells.
Annual Reviews of Immunology: **18**, 767-811.
- [27] **Banchereau, J. and Steinman, R. M.** (1998): Dendritic cells and the control of immunity.
Nature: **392**, (6673) 245-252.
- [28] **Barbieri, D., Abbracchio, M. P., Salvioli, S., Monti, D., Cossarizza, A., Ceruti, S., Brambilla, R., Cattabeni, F., Jacobson, K. A., and Franceschi, C.** (1998): Apoptosis by 2-chloro-2'-deoxy-adenosine and 2-chloro-adenosine in human peripheral blood mononuclear cells.
Neurochemistry International: **32**, (5-6) 493-504.
- [29] **Bargatze, R. F., Jutila, M. A., and Butcher, E. C.** (1995): Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined.
Immunity: **3**, (1) 99-108.
- [30] **Barnett, A. H., Eff, C., Leslie, R. D., and Pyke, D. A.** (1981): Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs.
Diabetologia: **20**, (2) 87-93.
- [31] **Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T., and Brenner, M. B.** (1994): Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells.
Nature: **372**, (6507) 691-694.
- [32] **Becton-Dickinson** (1994a): *Attractors Software User's Guide*. 15-76. Becton-Dickinson, San Jose.

- [33] **Becton-Dickinson** (1994b): *CELLQuest Software User's Guide*. 33-151. Becton-Dickinson, San Jose.
- [34] **Becton-Dickinson** (1996): *FACSCalibur System User's Guide*. 31-74. Becton-Dickinson, San Jose.
- [35] **Becton-Dickinson** (1997): *FACSComp Software Reference Manual*. 19-77. Becton-Dickinson, San Jose.
- [36] **Bedner, E., Smolewski, P., Amstad, P., and Darzynkiewicz, Z.** (2000): Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Experimental Cell Research*: **259**, (1) 308-313.
- [37] **Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., and Brutkiewicz, R. R.** (1995): CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*: **268**, (5212) 863-865.
- [38] **Bijl, M., Horst, G., Limburg, P. C., and Kallenberg, C. G.** (2001): Anti-CD3-induced and anti-Fas-induced apoptosis in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Immunology*: **123**, (1) 127-132.
- [39] **Bijl, M., Limburg, P. C., and Kallenberg, C. G.** (2001): New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis. *The Netherlands Journal of Medicine*: **59**, (2) 66-75.
- [40] **Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R., and Reiner, S. L.** (1998): Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*: **9**, (2) 229-237.

- [41] **Birkeland, M. L., Johnson, P., Trowbridge, I. S., and Pure, E.** (1989): Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **86**, (17) 6734-6738.
- [42] **Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.** (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.
Nature: **329**, (6139) 506-512.
- [43] **Blanchard, H., Kodandapani, L., Mittl, P. R., Marco, S. D., Krebs, J. F., Wu, J. C., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G.** (1999): The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis.
Structure: **7**, (9) 1125-1133.
- [44] **Blumberg, R. S., Ley, S., Sancho, J., Lonberg, N., Lacy, E., McDermott, F., Schad, V., Greenstein, J. L., and Terhorst, C.** (1990): Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **87**, (18) 7220-7224.
- [45] **BmT GmbH** (2002): *Arbeitsanleitung: Fluoro-Beads-B*.
1-5. One Lambda Generalvertretung, Krefeld.
- [46] **Bolstad, A. I., Wargelius, A., Nakken, B., Haga, H. J., and Jonsson, R.** (2000): Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjogren's syndrome.
The Journal of Rheumatology: **27**, (10) 2397-2405.
- [47] **Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A., and Doniach, D.** (1974): Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune

polyendocrine deficiencies.

Lancet: **2**, (7892) 1279-1283.

- [48] **Bradbury, A., Belt, K. T., Neri, T. M., Milstein, C., and Calabi, F.** (1988): Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus.
The EMBO Journal: **7**, (10) 3081-3086.

- [49] **Briken, V., Jackman, R. M., Watts, G. F., Rogers, R. A., and Porcelli, S. A.** (2000): Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens.
The Journal of Experimental Medicine: **192**, (2) 281-288.

- [50] **Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C.** (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.
Nature: **364**, (6432) 33-39.

- [51] **Burdin, N., Brossay, L., and Kronenberg, M.** (1999): Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis.
European Journal of Immunology: **29**, (6) 2014-2025.

- [52] **Butcher, E. C. and Picker, L. J.** (1996): Lymphocyte homing and homeostasis.
Science: **272**, (5258) 60-66.

- [53] **Calabi, F., Jarvis, J. M., Martin, L., and Milstein, C.** (1989): Two classes of CD1 genes.
European Journal of Immunology: **19**, (2) 285-292.

- [54] **Campbell, J. J. and Butcher, E. C.** (2000): Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing.
Current Opinion in Immunology: **12**, (3) 336-341.
- [55] **Casamayor-Palleja, M., Khan, M., and MacLennan, I. C.** (1995): A subset of CD4⁺ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex.
The Journal of Experimental Medicine: **181**, (4) 1293-1301.
- [56] **Castellanos, M. C., Lopez-Giral, S., Lopez-Cabrera, M., and de Landazuri, M. O.** (2002): Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69.
European Journal of Immunology: **32**, (11) 3108-3117.
- [57] **Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R. N.** (1997): Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture.
Human Immunology: **54**, (2) 159-169.
- [58] **Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J.** (1992): GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.
Nature: **360**, (6401) 258-261.
- [59] **Cebrian, M., Yague, E., Rincon, M., Lopez-Botet, M., de Landazuri, M. O., and Sanchez-Madrid, F.** (1988): Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine: **168**, (5) 1621-1637.
- [60] **Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A.** (1997): Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II

complexes on dendritic cells.

Nature: **388**, (6644) 782-787.

- [61] **Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A., and Strominger, J. L.** (1992): Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size.
Nature: **358**, (6389) 764-768.
- [62] **Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M.** (1995): FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.
Cell: **81**, (4) 505-512.
- [63] **Chiu, Y. H., Jayawardena, J., Weiss, A., Lee, D., Park, S. H., Dautry-Varsat, A., and Bendelac, A.** (1999): Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments.
The Journal of Experimental Medicine: **189**, (1) 103-110.
- [64] **Christgau, S., Aanstoot, H. J., Schierbeck, H., Begley, K., Tullin, S., Hejnaes, K., and Baekkeskov, S.** (1992): Membrane anchoring of the autoantigen GAD65 to microvesicles in pancreatic beta-cells by palmitoylation in the NH2-terminal domain.
Journal of Cell Biology: **118**, (2) 309-320.
- [65] **Christianson, S. W., Shultz, L. D., and Leiter, E. H.** (1993): Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors.
Diabetes: **42**, (1) 44-55.
- [66] **Clerici, M., DePalma, L., Roilides, E., Baker, R., and Shearer, G. M.** (1993): Analysis of T helper and antigen-presenting cell functions in cord blood and peripheral blood leukocytes from healthy

children of different ages.

The Journal of Clinical Investigation: **91**, (6) 2829-2836.

- [67] **Cossarizza, A.**: Measure of mitochondrial membrane potential with the fluorescent probe JC-1,
<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/amfc/data/page13.htm>

- [68] **Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C.** (1993): A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).
Biochemical and Biophysical Research Communication: **197**, (1) 40-45.

- [69] **Croft, M., Bradley, L. M., and Swain, S. L.** (1994): Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells.
The Journal of Immunology: **152**, (6) 2675-2685.

- [70] **Croft, M. and Swain, S. L.** (1992): Analysis of CD4+ T cells that provide contact-dependent bystander help to B cells.
The Journal of Immunology: **149**, (10) 3157-3165.

- [71] **Cyster, J. G.** (1999): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science: **286**, (5447) 2098-2102.

- [72] **Czerkinsky, C. C., Nilsson, L. A., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A.** (1983): A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells.
Journal of Immunological Methods: **65**, (1-2) 109-121.

- [73] **Dariavach, P., Mattei, M. G., Golstein, P., and Lefranc, M. P.** (1988): Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains.
European Journal of Immunology: **18**, (12) 1901-1905.
- [74] **Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., and Traganos, F.** (1997): Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).
Cytometry: **27**, (1) 1-20.
- [75] **Davis, J. E., Smyth, M. J., and Trapani, J. A.** (2001): Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity.
European Journal of Immunology: **31**, (1) 39-47.
- [76] **Dean, J. H., Connor, R., Herberman, R. B., Silva, J., McCoy, J. L., and Oldham, R. K.** (1977): The relative proliferation index as a more sensitive parameter for evaluating lymphoproliferative responses of cancer patients to mitogens and alloantigens.
International Journal of Cancer: **20**, (3) 359-370.
- [77] **Deapen, D., Escalante, A., Weinrib, L., Horwitz, D., Bachman, B., Roy-Burman, P., Walker, A., and Mack, T. M.** (1992): A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus.
Arthritis & Rheumatism: **35**, (3) 311-318.
- [78] **Dennis, E. A. and Kennedy, E. P.** (1972): Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria.
Journal of Lipid Research: **13**, (2) 263-267.
- [79] **Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C.** (1985): Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **82**, (12) 4230-4234.

- [80] **Depper, J. M., Leonard, W. J., Robb, R. J., Waldmann, T. A., and Greene, W. C.** (1983): Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*: **131**, (2) 690-696.
- [81] **Diethelm-Okita, B. M., Okita, D. K., Banaszak, L., and Conti-Fine, B. M.** (2000): Universal epitopes for human CD4+ cells on tetanus and diphtheria toxins. *The Journal of Infectious Diseases*: **181**, (3) 1001-1009.
- [82] **Diethelm-Okita, B. M., Raju, R., Okita, D. K., and Conti-Fine, B. M.** (1997): Epitope repertoire of human CD4+ T cells on tetanus toxin: identification of immunodominant sequence segments. *The Journal of Infectious Diseases*: **175**, (2) 382-391.
- [83] **Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C.** (1998): Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of Experimental Medicine*: **188**, (2) 373-386.
- [84] **Dong, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A.** (2001): Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *Journal of Clinical Immunology*: **21**, (4) 253-257.
- [85] **Dutronc, Y. and Porcelli, S. A.** (2002): The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens*: **60**, (5) 337-353.

- [86] **Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L.** (1998): T cell memory.
Annual Reviews of Immunology: **16**, 201-223.
- [87] **Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., and Schmitz, J.** (2000): BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.
The Journal of Immunology: **165**, (11) 6037-6046.
- [88] **Dzionic, A., Inagaki, Y., Okawa, K., Nagafune, J., Rock, J. J., Sohma, Y., Winkels, G., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. J.** (2002): Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions(1).
Human Immunology: **63**, (12) 1133-1148.
- [89] **Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J.** (2001): BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction.
The Journal of Experimental Medicine: **194**, (12) 1823-1834.
- [90] **Eisel, U., Jarausch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E., and Niemann, H.** (1986): Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins.
The EMBO Journal: **5**, (10) 2495-2502.
- [91] **Elliott, J. F., Qin, H. Y., Bhatti, S., Smith, D. K., Singh, R. K., Dillon, T., Lauzon, J., and Singh, B.** (1994): Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67)

prevents autoimmune diabetes in NOD mice.

Diabetes: **43**, (12) 1494-1499.

- [92] **Elliott, T., Cerundolo, V., Elvin, J., and Townsend, A.** (1991):
Peptide-induced conformational change of the class I heavy chain.
Nature: **351**, (6325) 402-406.
- [93] **Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A.,
and Nagata, S.** (1998): A caspase-activated DNase that degrades
DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
Nature: **391**, (6662) 43-50.
- [94] **Endl, J., Dreisbusch, B., Mitschke, G., and Geiger, A.** (2001):
*Abschlussbericht BMBF-Projekt Teilaufgabe II: Analyse von
antigenspezifischer T-Zell Aktivierung mittels multidimensionaler
Immunphänotypisierung.*
1te Auflage: 7-36. Roche, Penzberg.
- [95] **Endl, J., Otto, H., Jung, G., Dreisbusch, B., Donie, F., Stahl, P.,
Elbracht, R., Schmitz, G., Meinl, E., Hummel, M., Ziegler, A.
G., Wank, R., and Schendel, D. J.** (1997): Identification of
naturally processed T cell epitopes from glutamic acid
decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T
lymphocytes of recent onset IDDM patients.
The Journal of Clinical Investigation: **99**, (10) 2405-2415.
- [96] **Engstrand, M., Tournay, C., Peyrat, M. A., Eriksson, B. M.,
Wadstrom, J., Wirgart, B. Z., Romagne, F., Bonneville, M.,
Totterman, T. H., and Korsgren, O.** (2000): Characterization of
CMVpp65-specific CD8+ T lymphocytes using MHC tetramers in
kidney transplant patients and healthy participants.
Transplantation: **69**, (11) 2243-2250.
- [97] **Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J., Feldblum, S., Patel, N., and
Tobin, A. J.** (1991): Two genes encode distinct glutamate

decarboxylases.

Neuron: **7**, (1) 91-100.

- [98] **Exley, M., Garcia, J., Balk, S. P., and Porcelli, S.** (1997):

Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells.

The Journal of Experimental Medicine: **186**, (1) 109-120.

- [99] **Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M.** (2000): A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells.

Nature: **405**, (6782) 85-90.

- [100] **Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M., and Bratton, D. L.** (2001): Loss of phospholipid asymmetry and

surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts.

Journal of Biological Chemistry: **276**, (2) 1071-1077.

- [101] **Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M.** (1992): Exposure of phosphatidylserine

on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.

The Journal of Immunology: **148**, (7) 2207-2216.

- [102] **Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M.** (1996): Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-

mediated phagocytosis by human blood dendritic cells.

The Journal of Immunology: **157**, (2) 541-548.

- [103] **Fattorossi, A., Biselli, R., Casciaro, A., Trinchieri, V., and De Simone, C.** (1992): Oral polyvalent vaccine (Buccalin Berna)

administration activates selected T-cell subsets and regulates the expression of polymorphonuclear leukocyte membrane molecules.

Journal of Clinical Laboratory Immunology: **38**, (2) 95-101.

- [104] **Faure, F., Jitsukawa, S., Miossec, C., and Hercend, T.** (1990): CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells.
European Journal of Immunology: **20**, (3) 703-706.
- [105] **Fernandez-Miguel, G., Alarcon, B., Iglesias, A., Bluethmann, H., Alvarez-Mon, M., Sanz, E., and de la Hera, A.** (1999): Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **96**, (4) 1547-1552.
- [106] **Firestein, G. S., Yeo, M., and Zvaifler, N. J.** (1995): Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium.
The Journal of Clinical Investigation: **96**, (3) 1631-1638.
- [107] **Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E., and Lipp, M.** (1994): Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells.
Blood: **84**, (3) 830-840.
- [108] **Forster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M.** (1996): A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen.
Cell: **87**, (6) 1037-1047.
- [109] **Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M.** (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.
Cell: **99**, (1) 23-33.
- [110] **Fossum, S.** (1988): Lymph-borne dendritic leucocytes do not recirculate, but enter the lymph node paracortex to become

interdigitating cells.

Scandinavian Journal of Immunology: **27**, (1) 97-105.

- [111] **Freeman, G. J., Freedman, A. S., Segil, J. M., Lee, G., Whitman, J. F., and Nadler, L. M.** (1989): B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells.
The Journal of Immunology: **143**, (8) 2714-2722.
- [112] **Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, V. A. J., Lombard, L. A., Gray, G. S., and Nadler, L. M.** (1993): Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation.
Science: **262**, (5135) 909-911.
- [113] **Freiberg, B. A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D. M., and Kupfer, A.** (2002): Staging and resetting T cell activation in SMACs.
Nature Immunology: **3**, (10) 911-917.
- [114] **Fuller, K. A., Kanagawa, O., and Nahm, M. H.** (1993): T cells within germinal centers are specific for the immunizing antigen.
The Journal of Immunology: **151**, (9) 4505-4512.
- [115] **Gadola, S. D., Dulphy, N., Salio, M., and Cerundolo, V.** (2002): Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes.
The Journal of Immunology: **168**, (11) 5514-5520.
- [116] **Gadola, S. D., Zaccari, N. R., Harlos, K., Shepherd, D., Castro-Palomino, J. C., Ritter, G., Schmidt, R. R., Jones, E. Y., and Cerundolo, V.** (2002): Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains.
Nature Immunology: **3**, (8) 721-726.

- [117] **Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C.** (1996): Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2.
Nature: **384**, (6605) 134-141.
- [118] **Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A.** (1996): An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex.
Science: **274**, (5285) 209-219.
- [119] **Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., and Jenkins, M. K.** (1998): Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.
Science: **281**, (5373) 96-99.
- [120] **Genestier, L., Paillot, R., Fournel, S., Ferraro, C., Miossec, P., and Revillard, J. P.** (1998): Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells.
The Journal of Clinical Investigation: **102**, (2) 322-328.
- [121] **Gergely, P. J., Grossman, C., Niland, B., Puskas, F., Neupane, H., Allam, F., Banki, K., Phillips, P. E., and Perl, A.** (2002): Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis & Rheumatism: **46**, (1) 175-190.
- [122] **Giles, I. and Isenberg, D.** (2003): Lupus in the family--analysis of a cohort followed from 1978 to 1999.
Lupus: **10**, (1) 38-44.
- [123] **Gong, J., Stenger, S., Zack, J. A., Jones, B. E., Bristol, G. C., Modlin, R. L., Morrissey, P. J., and Barnes, P. F.** (1998): Isolation of mycobacterium-reactive CD1-restricted T cells from

patients with human immunodeficiency virus infection.

The Journal of Clinical Investigation: **101**, (2) 383-389.

- [124] **Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Nunez, G.** (1994): bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria.
Development: **120**, (10) 3033-3042.
- [125] **Gorczyca, W., Gong, J., and Darzynkiewicz, Z.** (1993): Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays.
Cancer Research: **53**, (8) 1945-1951.
- [126] **Gordon, C. and Salmon, M.** (2001): Update on systemic lupus erythematosus: autoantibodies and apoptosis.
Clinical Medicine: **1**, (1) 10-14.
- [127] **Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., and Kroczeck, R. A.** (1995): A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation.
European Journal of Immunology: **25**, (6) 1749-1754.
- [128] **Gramaglia, I., Weinberg, A. D., Lemon, M., and Croft, M.** (1998): Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses.
The Journal of Immunology: **161**, (12) 6510-6517.
- [129] **Graninger, W. B., Steiner, C. W., Graninger, M. T., Aringer, M., and Smolen, J. S.** (2000): Cytokine regulation of apoptosis and Bcl-2 expression in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus.
Cell Death and Differentiation: **7**, (10) 966-972.

- [130] **Gratama, J. W., van Esser, J. W., Lamers, C. H., Tournay, C., Lowenberg, B., Bolhuis, R. L., and Cornelissen, J. J.** (2001): Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection.
Blood: **98**, (5) 1358-1364.
- [131] **Green, D. R.** (1998): Apoptotic pathways: the roads to ruin.
Cell: **94**, (6) 695-698.
- [132] **Green, D. R. and Scott, D. W.** (1994): Activation-induced apoptosis in lymphocytes.
Current Opinion in Immunology: **6**, (3) 476-487.
- [133] **Green, J. M., Noel, P. J., Sperling, A. I., Walunas, T. L., Gray, G. S., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B.** (1994): Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice.
Immunity: **1**, (6) 501-508.
- [134] **Gregersen, P. K., Silver, J., and Winchester, R. J.** (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.
Arthritis & Rheumatism: **30**, (11) 1205-1213.
- [135] **Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R., and Ferguson, T. A.** (1995): Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.
Science: **270**, (5239) 1189-1192.
- [136] **Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J.** (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.
Genes & Development: **13**, (15) 1899-1911.

- [137] **Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J.** (1999): Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death.
Journal of Biological Chemistry: **274**, (2) 1156-1163.
- [138] **Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J.** (1997): The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.
The Journal of Experimental Medicine: **185**, (6) 1101-1111.
- [139] **Gulbranson-Judge, A. and MacLennan, I. C.** (1996): Sequential antigen-specific growth of T cells in the T zones and follicles in response to pigeon cytochrome c.
European Journal of Immunology: **26**, (8) 1830-1837.
- [140] **Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B., and Behar, S. M.** (2000): Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids.
Immunity: **12**, (2) 211-221.
- [141] **Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H.** (1999): Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization.
The Journal of Experimental Medicine: **189**, (3) 451-460.
- [142] **Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T.** (1998): A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **95**, (1) 258-263.

- [143] **Haneji, N., Nakamura, T., Takio, K., Yanagi, K., Higashiyama, H., Saito, I., Noji, S., Sugino, H., and Hayashi, Y.** (1997): Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome.
Science: **276**, (5312) 604-607.
- [144] **Hanninen, A., Jalkanen, S., Salmi, M., Toikkanen, S., Nikolakaros, G., and Simell, O.** (1992): Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus.
The Journal of Clinical Investigation: **90**, (5) 1901-1910.
- [145] **Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M. G., Luciani, M. F., and Golstein, P.** (1991): CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location.
The Journal of Immunology: **147**, (3) 1037-1044.
- [146] **Hasunuma, T., Hoa, T. T., Aono, H., Asahara, H., Yonehara, S., Yamamoto, K., Sumida, T., Gay, S., and Nishioka, K.** (1996): Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis.
International Immunology: **8**, (10) 1595-1602.
- [147] **Hayes, M. P., Berrebi, G. A., and Henkart, P. A.** (1989): Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A.
The Journal of Experimental Medicine: **170**, (3) 933-946.
- [148] **Hayward, A. R. and Shreiber, M.** (1989): Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of

insulinitis and diabetes.

The Journal of Immunology: **143**, (5) 1555-1559.

- [149] **Hedrick, S. M., Engel, I., McElligott, D. L., Fink, P. J., Hsu, M. L., Hansburg, D., and Matis, L. A.** (1988): Selection of amino acid sequences in the beta chain of the T cell antigen receptor.
Science: **239**, (4847) 1541-1544.
- [150] **Hermiston, M. L., Xu, Z., Majeti, R., and Weiss, A.** (2002):
Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases.
The Journal of Clinical Investigation: **109**, (1) 9-14.
- [151] **Herrmann, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., and Kalden, J. R.** (1998): Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis & Rheumatism: **41**, (7) 1241-1250.
- [152] **Herron, L. R., Eisenberg, R. A., Roper, E., Kakkanaiiah, V. N., Cohen, P. L., and Kotzin, B. L.** (1993): Selection of the T cell receptor repertoire in Lpr mice.
The Journal of Immunology: **151**, (7) 3450-3459.
- [153] **Hochberg, M. C.** (1997): Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.
Arthritis & Rheumatism: **40**, (9) 1725-1725.
- [154] **Hoffmeister, B., Kiecker, F., Tesfa, L., Volk, H. D., Picker, L. J., and Kern, F.** (2003): Mapping T cell epitopes by flow cytometry.
Methods: **29**, (3) 270-281.
- [155] **Hollenbaugh, D., Grosmaire, L. S., Kullas, C. D., Chalupny, N. J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R. J., Stamenkovic, I.,**

- Ledbetter, J. A., and Aruffo, A.** (1992): The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity.
The EMBO Journal: **11**, (12) 4313-4321.
- [156] **Honeyman, M. C., Cram, D. S., and Harrison, L. C.** (1993): Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes.
The Journal of Experimental Medicine: **177**, (2) 535-540.
- [157] **Horn, G. T., Bugawan, T. L., Long, C. M., and Erlich, H. A.** (1988): Allelic sequence variation of the HLA-DQ loci: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **85**, (16) 6012-6016.
- [158] **Horwitz, M. S., Bradley, L. M., Harbertson, J., Krah, T., Lee, J., and Sarvetnick, N.** (1998): Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry.
Nature Medicine: **4**, (7) 781-785.
- [159] **Hu, H., Huston, G., Duso, D., Lepak, N., Roman, E., and Swain, S. L.** (2001): CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division.
Nature Immunology: **2**, (8) 705-710.
- [160] **Huck, C., Endl, J., Walk, T., Noessner, E., Jung, G., Wank, R., and Schendel, D. J.** (2001): HLA-DR53 molecules restrict glutamic acid decarboxylase peptide presentation to T cells of a Type I diabetes patient: specification of the trimolecular HLA-peptide/T-cell receptor complex.
Diabetologia: **44**, (1) 70-80.

- [161] **Hueber, A. O., Bernard, A. M., Herincs, Z., Couzinet, A., and He, H. T.** (2002): An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes.
EMBO Reports: **3**, (2) 190-196.
- [162] **Hug, H., Los, M., Hirt, W., and Debatin, K. M.** (1999): Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells.
Biochemistry: **38**, (42) 13906-13911.
- [163] **Hviid, L., Felsing, A., and Theander, T. G.** (1993): Kinetics of human T-cell expression of LFA-1, IL-2 receptor, and ICAM-1 following antigenic stimulation in vitro.
Journal of Clinical Laboratory Immunology: **40**, (4) 163-171.
- [164] **Iannone, F., Corrigan, V. M., and Panayi, G. S.** (1996): CD69 on synovial T cells in rheumatoid arthritis correlates with disease activity.
British Journal of Rheumatology: **35**, (4) 397-397.
- [165] **Iezzi, G., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A.** (2001): Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo.
The Journal of Experimental Medicine: **193**, (8) 987-993.
- [166] **Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., and Lanzavecchia, A.** (1999): The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization.
European Journal of Immunology: **29**, (12) 4092-4101.
- [167] **Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis, Germain, R. N., Mellman, I., and Steinman, R. M.** (2000): The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is

regulated by inflammatory stimuli.

The Journal of Experimental Medicine: **191**, (6) 927-936.

- [168] **Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M. K.** (1997): In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells.
The Journal of Experimental Medicine: **185**, (12) 2133-2141.
- [169] **Ingulli, E., Ulman, D. R., Lucido, M. M., and Jenkins, M. K.** (2002): In situ analysis reveals physical interactions between CD11b+ dendritic cells and antigen-specific CD4 T cells after subcutaneous injection of antigen.
The Journal of Immunology: **169**, (5) 2247-2252.
- [170] **Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J.** (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.
Nature: **388**, (6638) 190-195.
- [171] **Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsgaard, M., and Davis, M. M.** (2002): Direct observation of ligand recognition by T cells.
Nature: **419**, (6909) 845-849.
- [172] **Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S., and Ikehara, S.** (1999): A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells.
The Journal of Immunology: **163**, (3) 1409-1419.
- [173] **Itoh, N., Hanafusa, T., Miyazaki, A., Miyagawa, J., Yamagata, K., Yamamoto, K., Waguri, M., Imagawa, A., Tamura, S., and Inada, M.** (1993): Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and

adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients.

The Journal of Clinical Investigation: **92**, (5) 2313-2322.

- [174] **Itoh, N., Imagawa, A., Hanafusa, T., Waguri, M., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Moriwaki, M., Nakajima, H., Miyagawa, J., Namba, M., Makino, S., Nagata, S., Kono, N., and Matsuzawa, Y.** (1997): Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.
The Journal of Experimental Medicine: **186**, (4) 613-618.

- [175] **Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S.** (1991):
The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.
Cell: **66**, (2) 233-243.

- [176] **Jakob, T. and Udey, M. C.** (1998): Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo.
The Journal of Immunology: **160**, (8) 4067-4073.

- [177] **Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., and Kabouridis, P. S.** (2000):
The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling.
Seminars in Immunology: **12**, (1) 23-34.

- [178] **Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P. J., Dardenne, M., and Drexhage, H. A.** (1994):
Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulitis and beta-cell destruction in NOD mice.
Diabetes: **43**, (5) 667-675.

- [179] **Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y. H., Mehr, R., and Bendelac, A.** (2001): CD1d endosomal trafficking is

independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain.

Immunity: **15**, (6) 897-908.

- [180] **Jelsema, C. L. and Morre, D. J.** (1978): Distribution of phospholipid biosynthetic enzymes among cell components of rat liver.

Journal of Biological Chemistry: **253**, (21) 7960-7971.

- [181] **Jiang, G., den Hertog, J., Su, J., Noel, J., Sap, J., and Hunter, T.**

(1999): Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase- α .

Nature: **401**, (6753) 606-610.

- [182] **Jonsson, R., Haga, H.-J., and Gordon, T.** (2001): *Arthritis and Allied Conditions - a Textbook of Rheumatology*.

14te Auflage: 1736-1759. Lippencott Williams & Wiklins, Philadelphia.

- [183] **Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L.,**

Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997): Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions.

European Journal of Immunology: **27**, (12) 3135-3142.

- [184] **Jun, H. S., Khil, L. Y., and Yoon, J. W.** (2002): Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes.

Cellular and Molecular Life Sciences: **59**, (11) 1892-1901.

- [185] **Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., and Rieger, C.**

(1993): Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.

Journal of Immunological Methods: **159**, (1-2) 197-207.

- [186] **Junghans, R. P., Stone, A. L., and Lewis, M. S.** (1996): Biophysical

characterization of a recombinant soluble interleukin 2 receptor

(Tac). Evidence for a monomeric structure.

Journal of Biological Chemistry: **271**, (18) 10453-10460.

- [187] **Junghans, R. P. and Waldmann, T. A.** (1996): Metabolism of Tac (IL2Ralpha): physiology of cell surface shedding and renal catabolism, and suppression of catabolism by antibody binding. *The Journal of Experimental Medicine*: **183**, (4) 1587-1602.
- [188] **Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.** (1994): Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*: **369**, (6475) 31-37.
- [189] **Kagi, D., Odermatt, B., Seiler, P., Zinkernagel, R. M., Mak, T. W., and Hengartner, H.** (1997): Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *The Journal of Experimental Medicine*: **186**, (7) 989-997.
- [190] **Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A.** (2000): Signal transduction by the TCR for antigen. *Current Opinion in Immunology*: **12**, (3) 242-249.
- [191] **Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A.** (2002): It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends in Immunology*: **23**, (8) 413-420.
- [192] **Kang, S. J. and Cresswell, P.** (2002): Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. *The EMBO Journal*: **21**, (7) 1650-1660.
- [193] **Karlsen, A. E., Hagopian, W. A., Grubin, C. E., Dube, S., Disteché, C. M., Adler, D. A., Barmeier, H., Mathewes, S., Grant, F. J., and Foster, D.** (1991): Cloning and primary structure of a human

islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **88**, (19) 8337-8341.

- [194] **Kaufman, D. L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G. S., Robinson, P., Atkinson, M. A., Sercarz, E. E., Tobin, A. J., and Lehmann, P. V.** (1993): Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes.
Nature: **366**, (6450) 69-72.
- [195] **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H., and Taniguchi, M.** (1997): CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides.
Science: **278**, (5343) 1626-1629.
- [196] **Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y., and Jenkins, M. K.** (1994): Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo.
Immunity: **1**, (4) 327-339.
- [197] **Khoruts, A., Mondino, A., Pape, K. A., Reiner, S. L., and Jenkins, M. K.** (1998): A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism.
The Journal of Experimental Medicine: **187**, (2) 225-236.
- [198] **Kim, J., Richter, W., Aanstoot, H. J., Shi, Y., Fu, Q., Rajotte, R., Warnock, G., and Baekkeskov, S.** (1993): Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat, and mouse pancreatic islets.
Diabetes: **42**, (12) 1799-1808.

- [199] **Klausner, R. D., Donaldson, J. G., and Lippincott-Schwartz, J.** (1992): Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure.
Journal of Cell Biology: **116**, (5) 1071-1080.
- [200] **Kletsas, D., Barbieri, D., Stathakos, D., Botti, B., Bergamini, S., Tomasi, A., Monti, D., Malorni, W., and Franceschi, C.** (1998): The highly reducing sugar 2-deoxy-D-ribose induces apoptosis in human fibroblasts by reduced glutathione depletion and cytoskeletal disruption.
Biochemical and Biophysical Research Communication: **243**, (2) 416-425.
- [201] **Klimiuk, P. A., Yang, H., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M.** (1999): Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent.
Clinical Immunology: **90**, (1) 65-78.
- [202] **Kojima, T., Horiuchi, T., Nishizaka, H., Sawabe, T., Higuchi, M., Harashima, S. I., Yoshizawa, S., Tsukamoto, H., Nagasawa, K., and Niho, Y.** (2000): Analysis of fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis & Rheumatism: **43**, (1) 135-139.
- [203] **Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M., and Sumida, T.** (2001): Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases.
Arthritis & Rheumatism: **44**, (5) 1127-1138.
- [204] **Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B., and Bachmann, M. F.** (1999): OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection.
Immunity: **11**, (6) 699-708.

- [205] **Kotzin, B. L., Falta, M. T., Crawford, F., Rosloniec, E. F., Bill, J., Marrack, P., and Kappler, J.** (2000): Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **97**, (1) 291-296.
- [206] **Kovacs, B. and Tsokos, G. C.** (1995): Cross-linking of the Fas/APO-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes.
The Journal of Immunology: **155**, (12) 5543-5549.
- [207] **Kozono, H., White, J., Clements, J., Marrack, P., and Kappler, J.** (1994): Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides.
Nature: **369**, (6476) 151-154.
- [208] **Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M., and Bucana, C.** (1990): Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization.
The Journal of Immunology: **145**, (9) 2833-2838.
- [209] **Krummel, M. F. and Allison, J. P.** (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation.
The Journal of Experimental Medicine: **182**, (2) 459-465.
- [210] **Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S. W., and Bockenstedt, L. K.** (2000): Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*.
The Journal of Immunology: **165**, (9) 4797-4801.
- [211] **Kupfer, H., Monks, C. R., and Kupfer, A.** (1994): Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-

presenting cell interactions.

The Journal of Experimental Medicine: **179**, (5) 1507-1515.

- [212] **Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K., and Notkins, A. L.**

(1996): IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **93**, (13) 6367-6370.

- [213] **Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.**

(2000): Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells.

Nature Immunology: **1**, (4) 311-316.

- [214] **Larsen, C. P., Steinman, R. M., Witmer-Pack, M., Hankins, D. F.,**

Morris, P. J., and Austyn, J. M. (1990): Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants.

The Journal of Experimental Medicine: **172**, (5) 1483-1493.

- [215] **Lee, K. U., Amano, K., and Yoon, J. W.** (1988): Evidence for initial

involvement of macrophage in development of insulitis in NOD mice.

Diabetes: **37**, (7) 989-991.

- [216] **Leica Mikroskopie und Systeme GmbH** (1990): *Leitz Patimed,*

Anwendungstechnische Mitteilung - Installation und Funktionsprüfung.

1-16. Produktmanagement Anwendungstechnik, Wetzlar.

- [217] **Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K.,**

Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M.,

Krammer, P. H., and Moller, P. (1993): Constitutive and

induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and

neoplastic cells.

Laboratory Investigation: **69**, (4) 415-429.

- [218] **Lenardo, M. J.** (1991): Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis.
Nature: **353**, (6347) 858-861.

- [219] **Lenschow, D. J., Su, G. H., Zuckerman, L. A., Nabavi, N., Jellis, C. L., Gray, G. S., Miller, J., and Bluestone, J. A.** (1993):
Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **90**, (23) 11054-11058.

- [220] **Lenschow, D. J., Walunas, T. L., and Bluestone, J. A.** (1996):
CD28/B7 system of T cell costimulation.
Annual Reviews of Immunology: **14**, 233-258.

- [221] **Lepple-Wienhues, A., Belka, C., Laun, T., Jekle, A., Walter, B., Wieland, U., Welz, M., Heil, L., Kun, J., Busch, G., Weller, M., Bamberg, M., Gulbins, E., and Lang, F.** (1999): Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **96**, (24) 13795-13800.

- [222] **Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J.** (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.
Cell: **94**, (4) 491-501.

- [223] **Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X.** (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an

apoptotic protease cascade.

Cell: **91**, (4) 479-489.

- [224] **Lin, A.** (2003): Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis.

Bioessays: **25**, (1) 17-24.

- [225] **Lindsten, T., Lee, K. P., Harris, E. S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P. J., Lombard, D. B., Freeman, G. J., Nadler, L. M., and Gray, G. S.** (1993): Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells.

The Journal of Immunology: **151**, (7) 3489-3499.

- [226] **Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A.** (1991): Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.

The Journal of Experimental Medicine: **173**, (3) 721-730.

- [227] **Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A.** (1991): CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7.

The Journal of Experimental Medicine: **174**, (3) 561-569.

- [228] **Linsley, P. S., Clark, E. A., and Ledbetter, J. A.** (1990): T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **87**, (13) 5031-5035.

- [229] **Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., and Peach, R.** (1994): Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors.

Immunity: **1**, (9) 793-801.

- [230] **Linsley, P. S., Greene, J. L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Anasetti, C., and Damle, N. K.** (1992): Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine: **176**, (6) 1595-1604.
- [231] **Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.** (1996): Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.
Cell: **86**, (1) 147-157.
- [232] **Lohmann, T., Leslie, R. D., Hawa, M., Geysen, M., Rodda, S., and Londei, M.** (1994): Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus.
Lancet: **343**, (8913) 1607-1608.
- [233] **Lopez-Cabrera, M., Santis, A. G., Fernandez-Ruiz, E., Blacher, R., Esch, F., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F.** (1993): Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors.
The Journal of Experimental Medicine: **178**, (2) 537-547.
- [234] **Ludewig, B., Junt, T., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M.** (2001): Dendritic cells in autoimmune diseases.
Current Opinion in Immunology: **13**, (6) 657-662.
- [235] **Ludewig, B., Ochsenbein, A. F., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M.** (2000): Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease.
The Journal of Experimental Medicine: **191**, (5) 795-804.

- [236] **Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X.** (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.
Cell: **94**, (4) 481-490.
- [237] **Luther, S. A., Gulbranson-Judge, A., Acha-Orbea, H., and MacLennan, I. C.** (1997): Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B cell differentiation leading to virus-specific antibody production.
The Journal of Experimental Medicine: **185**, (3) 551-562.
- [238] **Lynch, K. W. and Weiss, A.** (2000): A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras.
Molecular and Cellular Biology: **20**, (1) 70-80.
- [239] **Ma, S. W., Zhao, D. L., Yin, Z. Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H. Y., Stiller, C. R., and Jevnikar, A. M.** (1997): Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance.
Nature Medicine: **3**, (7) 793-796.
- [240] **MacDonald, K. P., Nishioka, Y., Lipsky, P. E., and Thomas, R.** (1997): Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis.
The Journal of Clinical Investigation: **100**, (9) 2404-2414.
- [241] **Mackay, C. R., Marston, W. L., and Dudler, L.** (1990): Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation.
The Journal of Experimental Medicine: **171**, (3) 801-817.
- [242] **Maecker, H. T., Dunn, H. S., Suni, M. A., Khatamzas, E., Pitcher, C. J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T. M., Sinclair, E.,**

- Bredt, B. M., McCune, J. M., Maino, V. C., Kern, F., and Picker, L. J.** (2001): Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry.
Journal of Immunological Methods: **255**, (1-2) 27-40.
- [243] **Mallett, S., Fossum, S., and Barclay, A. N.** (1990): Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes - a molecule related to nerve growth factor receptor.
The EMBO Journal: **9**, (4) 1063-1068.
- [244] **Mangeney, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T., and Wiels, J.** (1991): CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis.
European Journal of Immunology: **21**, (5) 1131-1140.
- [245] **Manoussakis, M. N., Dimitriou, I. D., Kapsogeorgou, E. K., Xanthou, G., Paikos, S., Polihronis, M., and Moutsopoulos, H. M.** (1999): Expression of B7 costimulatory molecules by salivary gland epithelial cells in patients with Sjogren's syndrome.
Arthritis & Rheumatism: **42**, (2) 229-239.
- [246] **Manz, R., Assenmacher, M., Pfluger, E., Miltenyi, S., and Radbruch, A.** (1995): Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **92**, (6) 1921-1925.
- [247] **Maron, R., Elias, D., de Jongh, B. M., Bruining, G. J., van Rood, J. J., Shechter, Y., and Cohen, I. R.** (1983): Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes.
Nature: **303**, (5920) 817-818.
- [248] **Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Geraghty, D. E., Hansen, J. A., Mach, B., Mayr, W. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T.,**

- Schreuder, G. M., Strominger, J. L., Svejgaard, A., and Terasaki, P. I.** (2002): Nomenclature for factors of the HLA system, 2002.
Human Immunology: **63**, (12) 1213-1268.
- [249] **Martin, D. A., Zheng, L., Siegel, R. M., Huang, B., Fisher, G. H., Wang, J., Jackson, C. E., Puck, J. M., Dale, J., Straus, S. E., Peter, M. E., Krammer, P. H., Fesik, S., and Lenardo, M. J.** (1999): Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **96**, (8) 4552-4557.
- [250] **Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R.** (1995): Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.
The Journal of Experimental Medicine: **182**, (5) 1545-1556.
- [251] **Matsui, K., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H., Fazekas, d. S. G., and Davis, M. M.** (1991): Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors.
Science: **254**, (5039) 1788-1791.
- [252] **Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A., and Wilson, I. A.** (1992): Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules.
Science: **257**, (5072) 927-934.
- [253] **McHeyzer-Williams, L. J., Panus, J. F., Mikszta, J. A., and McHeyzer-Williams, M. G.** (1999): Evolution of antigen-specific T cell receptors in vivo: preimmune and antigen-driven selection of preferred complementarity-determining region 3 (CDR3) motifs.
The Journal of Experimental Medicine: **189**, (11) 1823-1838.

- [254] **McHeyzer-Williams, M. G. and Davis, M. M.** (1995): Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo.
Science: **268**, (5207) 106-111.
- [255] **McClean, A. R. and Michie, C. A.** (1995): In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **92**, (9) 3707-3711.
- [256] **McWilliam, A. S., Napoli, S., Marsh, A. M., Pemper, F. L., Nelson, D. J., Pimm, C. L., Stumbles, P. A., Wells, T. N., and Holt, P. G.** (1996): Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli.
The Journal of Experimental Medicine: **184**, (6) 2429-2432.
- [257] **Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E.** (1997): FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC).
The EMBO Journal: **16**, (10) 2794-2804.
- [258] **Merica, R., Khoruts, A., Pape, K. A., Reinhardt, R. L., and Jenkins, M. K.** (2000): Antigen-experienced CD4 T cells display a reduced capacity for clonal expansion in vivo that is imposed by factors present in the immune host.
The Journal of Immunology: **164**, (9) 4551-4557.
- [259] **Meuer, S. C., Acuto, O., Hussey, R. E., Hodgdon, J. C., Fitzgerald, K. A., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L.** (1983): Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor.
Nature: **303**, (5920) 808-810.
- [260] **Meuer, S. C., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L.** (1982): Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector

T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **79**, (14) 4395-4399.

- [261] **Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G.** (1997): Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *Journal of Biological Chemistry*: **272**, (10) 6539-6547.
- [262] **Mommaas, A. M., Mulder, A. A., Jordens, R., Out, C., Tan, M. C., Cresswell, P., Kluin, P. M., and Koning, F.** (1999): Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *European Journal of Immunology*: **29**, (2) 571-580.
- [263] **Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A.** (1998): Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*: **395**, (6697) 82-86.
- [264] **Monti, D., Salvioli, S., Capri, M., Malorni, W., Straface, E., Cossarizza, A., Botti, B., Piacentini, M., Baggio, G., Barbi, C., Valensin, S., Bonafe, M., and Franceschi, C.** (2000): Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. *Mechanisms of Ageing and Development*: **121**, (1-3) 239-250.
- [265] **Moody, D. B., Briken, V., Cheng, T. Y., Roura-Mir, C., Guy, M. R., Geho, D. H., Tykocinski, M. L., Besra, G. S., and Porcelli, S. A.** (2002): Lipid length controls antigen entry into endosomal and

nonendosomal pathways for CD1b presentation.

Nature Immunology: **3**, (5) 435-442.

- [266] **Moody, D. B., Ulrichs, T., Muhlecker, W., Young, D. C., Gurcha, S. S., Grant, E., Rosat, J. P., Brenner, M. B., Costello, C. E., Besra, G. S., and Porcelli, S. A.** (2000): CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection.
Nature: **404**, (6780) 884-888.
- [267] **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L.** (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.
The Journal of Immunology: **136**, (7) 2348-2357.
- [268] **Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L.** (2000): Signaling and transcription in T helper development.
Annual Reviews of Immunology: **18**, 451-494.
- [269] **Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M.** (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.
Cell: **85**, (6) 817-827.
- [270] **Nagata, S. and Suda, T.** (1995): Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations.
Immunology Today: **16**, (1) 39-43.
- [271] **Naidenko, O. V., Maher, J. K., Ernst, W. A., Sakai, T., Modlin, R. L., and Kronenberg, M.** (1999): Binding and antigen presentation of

ceramide-containing glycolipids by soluble mouse and human CD1d molecules.

The Journal of Experimental Medicine: **190**, (8) 1069-1080.

- [272] **Naismith, J. H. and Sprang, S. R.** (1998): Modularity in the TNF-receptor family.

Trends in Biochemical Sciences: **23**, (2) 74-79.

- [273] **Nakajima, H., Park, H. L., and Henkart, P. A.** (1995): Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin.

The Journal of Experimental Medicine: **181**, (3) 1037-1046.

- [274] **Namekawa, T., Wagner, U. G., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M.** (1998): Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis.

Arthritis & Rheumatism: **41**, (12) 2108-2116.

- [275] **Ngo, V. N., Korner, H., Gunn, M. D., Schmidt, K. N., Riminton, D. S., Cooper, M. D., Browning, J. L., Sedgwick, J. D., and Cyster, J. G.** (1999): Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen.

The Journal of Experimental Medicine: **189**, (2) 403-412.

- [276] **Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Exley, M., Schleipman, R. A., Glickman, J., Bailey, D. T., Corazza, N., Colgan, S. P., Onderdonk, A. B., and Blumberg, R. S.** (2002): CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung.

Nature Medicine: **8**, (6) 588-593.

- [277] **Nijman, H. W., Kleijmeer, M. J., Ossevoort, M. A., Oorschot, V. M., Vierboom, M. P., van de Keur, M., Kenemans, P., Kast, W. M., Geuze, H. J., and Melief, C. J.** (1995): Antigen capture and

major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells.

The Journal of Experimental Medicine: **182**, (1) 163-174.

- [278] **Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., and Aruffo, A.** (1992): A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **89**, (14) 6550-6554.

- [279] **Nomura, L. E., Walker, J. M., and Maecker, H. T.** (2000): Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells.

Cytometry: **40**, (1) 60-68.

- [280] **O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N., and Steinman, R. M.** (1994): Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.

Immunology: **82**, (3) 487-493.

- [281] **O'Doherty, U., Steinman, R. M., Peng, M., Cameron, P. U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W. J., Pope, M., and Bhardwaj, N.** (1993): Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium.

The Journal of Experimental Medicine: **178**, (3) 1067-1076.

- [282] **Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., and Trauth, B. C.** (1992): Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas

antigen.

Journal of Biological Chemistry: **267**, (15) 10709-10715.

- [283] **Ogawa, N., Dang, H., Kong, L., Anaya, J. M., Liu, G. T., and Talal, N.** (1996): Lymphocyte apoptosis and apoptosis-associated gene expression in Sjogren's syndrome.
Arthritis & Rheumatism: **39**, (11) 1875-1885.
- [284] **Ohlsson, M., Skarstein, K., Bolstad, A. I., Johannessen, A. C., and Jonsson, R.** (2001): Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjogren's syndrome.
Laboratory Investigation: **81**, (1) 95-105.
- [285] **Ohlsson, M., Szodoray, P., Loro, L. L., Johannessen, A. C., and Jonsson, R.** (2002): CD40, CD154, Bax and Bcl-2 expression in Sjogren's syndrome salivary glands: a putative anti-apoptotic role during its effector phases.
Scandinavian Journal of Immunology: **56**, (6) 561-571.
- [286] **Ohsako, S., Hara, M., Harigai, M., Fukasawa, C., and Kashiwazaki, S.** (1994): Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes.
Clinical Immunology and Immunopathology: **73**, (1) 109-114.
- [287] **Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G.** (1997): Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells.
The Journal of Immunology: **159**, (8) 3838-3848.
- [288] **Olsen, N. J., Callahan, L. F., Brooks, R. H., Nance, E. P., Kaye, J. J., Stastny, P., and Pincus, T.** (1988): Associations of HLA-DR4 with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis.
The American Journal of Medicine: **84**, (2) 257-264.

- [289] **Olweus, J., BitMansour, A., Warnke, R., Thompson, P. A., Carballido, J., Picker, L. J., and Lund-Johansen, F.** (1997): Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **94**, (23) 12551-12556.
- [290] **Oomes, P. G., Jacobs, B. C., Hazenberg, M. P., Banffer, J. R., and van der Meche, F. G.** (1995): Anti-GM1 IgG antibodies and *Campylobacter* bacteria in Guillain-Barre syndrome: evidence of molecular mimicry.
Annals of Neurology: **38**, (2) 170-175.
- [291] **Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., and Miyazaki, S.** (1996): Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells.
The Journal of Immunology: **157**, (7) 2909-2915.
- [292] **Ozaki, Y., Amakawa, R., Ito, T., Iwai, H., Tajima, K., Uehira, K., Kagawa, H., Uemura, Y., Yamashita, T., and Fukuhara, S.** (2001): Alteration of peripheral blood dendritic cells in patients with primary Sjogren's syndrome.
Arthritis & Rheumatism: **44**, (2) 419-431.
- [293] **Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K., and Paquette, T. L.** (1983): Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment.
Science: **222**, (4630) 1337-1339.
- [294] **Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J. C.** (1998): Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation.
The Journal of Immunology: **160**, (9) 4587-4595.

- [295] **Pamer, E. and Cresswell, P.** (1998): Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.
Annual Reviews of Immunology: **16**, 323-358.
- [296] **Pan, G., O'Rourke, K., and Dixit, V. M.** (1998): Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex.
Journal of Biological Chemistry: **273**, (10) 5841-5845.
- [297] **Panina-Bordignon, P., Lang, R., van Endert, P. M., Benazzi, E., Felix, A. M., Pastore, R. M., Spinaz, G. A., and Sinigaglia, F.** (1995): Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes.
The Journal of Experimental Medicine: **181**, (5) 1923-1927.
- [298] **Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., and Lanzavecchia, A.** (1989): Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells.
European Journal of Immunology: **19**, (12) 2237-2242.
- [299] **Pankewycz, O. G., Guan, J. X., and Benedict, J. F.** (1995): Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications.
Endocrine Reviews: **16**, (2) 164-176.
- [300] **Perez, V. L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Abbas, A. K.** (1997): Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement.
Immunity: **6**, (4) 411-417.
- [301] **Perniok, A., Wedekind, F., Herrmann, M., Specker, C., and Schneider, M.** (1998): High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus.
Lupus: **7**, (2) 113-118.

- [302] **Petersen, J. S., Karlsen, A. E., Markholst, H., Worsaae, A., Dyrberg, T., and Michelsen, B.** (1994): Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice.
Diabetes: **43**, (12) 1478-1484.
- [303] **Picker, L. J., Singh, M. K., Zdraveski, Z., Treer, J. R., Waldrop, S. L., Bergstresser, P. R., and Maino, V. C.** (1995): Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry.
Blood: **86**, (4) 1408-1419.
- [304] **Pickering, M. C. and Walport, M. J.** (2000): Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus.
Rheumatology: **39**, (2) 133-141.
- [305] **Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., and Knapp, W.** (1996): Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes.
The Journal of Immunology: **157**, (9) 3850-3859.
- [306] **Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., and Mellman, I.** (1997): Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells.
Nature: **388**, (6644) 787-792.
- [307] **Polihronis, M., Tapinos, N. I., Theocharis, S. E., Economou, A., Kittas, C., and Moutsopoulos, H. M.** (1998): Modes of epithelial cell death and repair in Sjogren's syndrome (SS).
Clinical and Experimental Immunology: **114**, (3) 485-490.
- [308] **Potter, T. A., Grebe, K., Freiberg, B., and Kupfer, A.** (2001): Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo

CD8+ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **98**, (22) 12624-12629.

- [309] **Prigozy, T. I., Sieling, P. A., Clemens, D., Stewart, P. L., Behar, S. M., Porcelli, S. A., Brenner, M. B., Modlin, R. L., and Kronenberg, M.** (1997): The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules.
Immunity: **6**, (2) 187-197.
- [310] **Randolph, D. A., Huang, G., Carruthers, C. J., Bromley, L. E., and Chaplin, D. D.** (1999): The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo.
Science: **286**, (5447) 2159-2162.
- [311] **Reece, J. C., McGregor, D. L., Geysen, H. M., and Rodda, S. J.** (1994): Scanning for T helper epitopes with human PBMC using pools of short synthetic peptides.
Journal of Immunological Methods: **172**, (2) 241-254.
- [312] **Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K.** (2001): Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body.
Nature: **410**, (6824) 101-105.
- [313] **Rescigno, M., Granucci, F., Citterio, S., Foti, M., and Ricciardi-Castagnoli, P.** (1999): Coordinated events during bacteria-induced DC maturation.
Immunology Today: **20**, (5) 200-203.
- [314] **Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M., and Liu, Y. J.** (1999): Reciprocal control of T helper

cell and dendritic cell differentiation.

Science: **283**, (5405) 1183-1186.

- [315] **Robb, R. J. and Kutny, R. M.** (1987): Structure-function relationships for the IL 2-receptor system. IV. Analysis of the sequence and ligand-binding properties of soluble Tac protein.
The Journal of Immunology: **139**, (3) 855-862.
- [316] **Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P.** (1989): Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo.
European Journal of Immunology: **19**, (5) 905-911.
- [317] **Roit, I. M., Brostoff, J., and Male, D. K.** (1995): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*.
3te Auflage: 31-42. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [318] **Rollins, B. J.** (1997): Chemokines.
Blood: **90**, (3) 909-928.
- [319] **Ronen, A. and Heddle, J. A.** (1984): Site-specific induction of nuclear anomalies (apoptotic bodies and micronuclei) by carcinogens in mice.
Cancer Research: **44**, (4) 1536-1540.
- [320] **Rose, L. M., Latchman, D. S., and Isenberg, D. A.** (1995): Bcl-2 expression is unaltered in unfractionated peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus.
British Journal of Rheumatology: **34**, (4) 316-320.
- [321] **Ross, R., Jonuleit, H., Bros, M., Ross, X. L., Yamashiro, S., Matsumura, F., Enk, A. H., Knop, J., and Reske-Kunz, A. B.** (2000): Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell

differentiation.

Journal of Investigative Dermatology: **115**, (4) 658-663.

- [322] **Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Langin, T., and Reske-Kunz, A. B.** (1998): The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells.
The Journal of Immunology: **160**, (8) 3776-3782.
- [323] **Rostaing, L., Tkaczuk, J., Durand, M., Peres, C., Durand, D., de Preval, C., Ohayon, E., and Abbai, M.** (1999): Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells.
Cytometry: **35**, (4) 318-328.
- [324] **Rothe, G., Gabriel, H., Kovacs, E., Klucken, J., Stohr, J., Kindermann, W., and Schmitz, G.** (1996): Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia.
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology: **16**, (12) 1437-1447.
- [325] **Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A. J.** (1991): Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules.
Nature: **353**, (6345) 622-627.
- [326] **Rudolph, M. G. and Wilson, I. A.** (2002): The specificity of TCR/pMHC interaction.
Current Opinion in Immunology: **14**, (1) 52-65.
- [327] **Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J., and Hwang, S. T.** (1999): Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration

pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes.

The Journal of Immunology: **162**, (5) 2472-2475.

- [328] **Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A.** (1995):

Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.

The Journal of Experimental Medicine: **182**, (2) 389-400.

- [329] **Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** (1994): Efficient presentation of

soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.

The Journal of Experimental Medicine: **179**, (4) 1109-1118.

- [330] **Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A.**

(1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.

Nature: **401**, (6754) 708-712.

- [331] **Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D.,**

Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998): Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation.

European Journal of Immunology: **28**, (9) 2760-2769.

- [332] **Salmon, M., Scheel-Toellner, D., Huissoon, A. P., Pilling, D.,**

Shamsadeen, N., Hyde, H., D'Angeac, A. D., Bacon, P. A., Emery, P., and Akbar, A. N. (1997): Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium.

The Journal of Clinical Investigation: **99**, (3) 439-446.

- [333] **Saltiel, A. R.** (2001): New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes.
Cell: **104**, (4) 517-529.
- [334] **Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., and Cossarizza, A.** (1997): JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis.
FEBS Letters: **411**, (1) 77-82.
- [335] **Sartorius, U., Schmitz, I., and Krammer, P. H.** (2001): Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.
ChemBioChem: **2**, (1) 20-29.
- [336] **Savage, P. A., Boniface, J. J., and Davis, M. M.** (1999): A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response.
Immunity: **10**, (4) 485-492.
- [337] **Schendel, S. L., Montal, M., and Reed, J. C.** (1998): Bcl-2 family proteins as ion-channels.
Cell Death and Differentiation: **5**, (5) 372-380.
- [338] **Schindowski, K., Leutner, S., Muller, W. E., and Eckert, A.** (2000): Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes.
Neurobiology of Aging: **21**, (5) 661-670.
- [339] **Schmidt, D., Martens, P. B., Weyand, C. M., and Goronzy, J. J.** (1996): The repertoire of CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis.
Molecular Medicine: **2**, (5) 608-618.

- [340] **Schulze-Koops, H., Davis, L. S., Haverty, T. P., Wacholtz, M. C., and Lipsky, P. E.** (1998): Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4.
The Journal of Rheumatology: **25**, (11) 2065-2076.
- [341] **Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E.** (1998): Apoptosis signaling by death receptors.
European Journal of Biochemistry: **254**, (3) 439-459.
- [342] **Scolding, N. J. and Joseph, F. G.** (2002): The neuropathology and pathogenesis of systemic lupus erythematosus.
Neuropathology and Applied Neurobiology: **28**, (3) 173-189.
- [343] **Semenzato, G., Bambara, L. M., Biasi, D., Frigo, A., Vinante, F., Zuppin, B., Trentin, L., Feruglio, C., Chilos, M., and Pizzolo, G.** (1988): Increased serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.
Journal of Clinical Immunology: **8**, (6) 447-452.
- [344] **Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A., Leiter, E. H., and Shultz, L. D.** (1996): B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice.
The Journal of Experimental Medicine: **184**, (5) 2049-2053.
- [345] **Setty, Y. N. and Komatireddy, G. R.** (2001): Antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome.
Frontiers in Bioscience: **6**, E207-E212.

- [346] **Shamshiev, A., Donda, A., Carena, I., Mori, L., Kappos, L., and De Libero, G.** (1999): Self glycolipids as T-cell autoantigens.
European Journal of Immunology: **29**, (5) 1667-1675.
- [347] **Shapiro, H. M.** (1995): *Practical Flow Cytometry*.
3te Auflage: 1-31. Wiley-Liss Inc., New York.
- [348] **Sharma, K., Wang, R. X., Zhang, L. Y., Yin, D. L., Luo, X. Y., Solomon, J. C., Jiang, R. F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D. W., and Shi, Y. F.** (2000): Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand.
Pharmacology & Therapeutics: **88**, (3) 333-347.
- [349] **Shi, L., Kam, C. M., Powers, J. C., Aebersold, R., and Greenberg, A. H.** (1992): Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions.
The Journal of Experimental Medicine: **176**, (6) 1521-1529.
- [350] **Shi, L., Kraut, R. P., Aebersold, R., and Greenberg, A. H.** (1992): A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis.
The Journal of Experimental Medicine: **175**, (2) 553-566.
- [351] **Shi, Y. F., Sahai, B. M., and Green, D. R.** (1989): Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes.
Nature: **339**, (6226) 625-626.
- [352] **Sieling, P. A., Chatterjee, D., Porcelli, S. A., Prigozy, T. I., Mazzaccaro, R. J., Soriano, T., Bloom, B. R., Brenner, M. B., Kronenberg, M., and Brennan, P. J.** (1995): CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens.
Science: **269**, (5221) 227-230.

- [353] **Singh, N., Hong, S., Scherer, D. C., Serizawa, I., Burdin, N., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L.** (1999): Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype.
The Journal of Immunology: **163**, (5) 2373-2377.
- [354] **Skapenko, A., Wendler, J., Lipsky, P. E., Kalden, J. R., and Schulze-Koops, H.** (1999): Altered memory T cell differentiation in patients with early rheumatoid arthritis.
The Journal of Immunology: **163**, (1) 491-499.
- [355] **Spada, F. M., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A.** (1998): CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells.
The Journal of Experimental Medicine: **188**, (8) 1529-1534.
- [356] **Stamenkovic, I., Clark, E. A., and Seed, B.** (1989): A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas.
The EMBO Journal: **8**, (5) 1403-1410.
- [357] **Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K.** (1997): Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs.
Immunological Reviews: **156**, 25-37.
- [358] **Straus, S. E., Sneller, M., Lenardo, M. J., Puck, J. M., and Strober, W.** (1999): An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome.
Annals of Internal Medicine: **130**, (7) 591-601.
- [359] **Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O., and Knapp, W.** (1998): Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with

dendritic precursor characteristics.

The Journal of Immunology: **161**, (2) 740-748.

- [360] **Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H. P., and Strober, W.** (1995): Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells.
Immunity: **2**, (5) 507-521.

- [361] **Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., and Nagata, S.** (1995): Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage.
The Journal of Immunology: **154**, (8) 3806-3813.

- [362] **Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S.** (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.
Cell: **75**, (6) 1169-1178.

- [363] **Sugita, M., Cao, X., Watts, G. F., Rogers, R. A., Bonifacino, J. S., and Brenner, M. B.** (2002): Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells.
Immunity: **16**, (5) 697-706.

- [364] **Sugita, M., Grant, E. P., van Donselaar, E., Hsu, V. W., Rogers, R. A., Peters, P. J., and Brenner, M. B.** (1999): Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules.
Immunity: **11**, (6) 743-752.

- [365] **Sugita, M., van Der Wel, N., Rogers, R. A., Peters, P. J., and Brenner, M. B.** (2000): CD1c molecules broadly survey the endocytic system.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **97**, (15) 8445-8450.

- [366] **Suni, M. A., Picker, L. J., and Maino, V. C.** (1998): Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry.
Journal of Immunological Methods: **212**, (1) 89-98.
- [367] **Swain, S. L.** (1994): Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells.
Immunity: **1**, (7) 543-552.
- [368] **Szeberenyi, J. B., Rothe, G., Pallinger, E., Orso, E., Falus, A., and Schmitz, G.** (2000): Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood.
Immunobiology: **202**, (1) 51-58.
- [369] **Tabata, H., Kanai, T., Yoshizumi, H., Nishiyama, S., Fujimoto, S., Matsuda, I., Yasukawa, M., Matsushita, S., and Nishimura, Y.** (1998): Characterization of self-glutamic acid decarboxylase 65-reactive CD4+ T-cell clones established from Japanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus.
Human Immunology: **59**, (9) 549-560.
- [370] **Tak, P. P., van der Lubbe, P. A., Cauli, A., Daha, M. R., Smeets, T. J., Kluin, P. M., Meinders, A. E., Yanni, G., Panayi, G. S., and Breedveld, F. C.** (1995): Reduction of synovial inflammation after anti-CD4 monoclonal antibody treatment in early rheumatoid arthritis.
Arthritis & Rheumatism: **38**, (10) 1457-1465.
- [371] **Takeda, A., Wu, J. J., and Maizel, A. L.** (1992): Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein.
Journal of Biological Chemistry: **267**, (23) 16651-16659.
- [372] **Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., and Sugamura, K.** (1992):

Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor.
Science: **257**, (5068) 379-382.

- [373] **Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M., and Nagata, S.** (1998):
Downregulation of Fas ligand by shedding.
Nature Medicine: **4**, (1) 31-36.
- [374] **Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R., and Udey, M. C.** (1993): Adhesion of epidermal Langerhans cells to
keratinocytes mediated by E-cadherin.
Nature: **361**, (6407) 82-85.
- [375] **Tang, H. L. and Cyster, J. G.** (1999): Chemokine Up-regulation and
activated T cell attraction by maturing dendritic cells.
Science: **284**, (5415) 819-822.
- [376] **Tarlinton, D. M. and Smith, K. G.** (1997): Apoptosis and the B cell
response to antigen.
International Reviews of Immunology: **15**, (1-2) 53-71.
- [377] **Tengner, P., Halse, A. K., Haga, H. J., Jonsson, R., and Wahren-Herlenius, M.** (1998): Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB
autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with
Sjogren's syndrome.
Arthritis & Rheumatism: **41**, (12) 2238-2248.
- [378] **Thomas, M., Shackelford, D., Ralph, S., and Trowbridge, I.** (1987):
Structural studies of T200 glycoprotein and the IL-2 receptor.
Journal of Receptor Research: **7**, (1-4) 133-155.
- [379] **Thomas, R. and Lipsky, P. E.** (1994): Human peripheral blood
dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor
and mature antigen-presenting cells.
The Journal of Immunology: **153**, (9) 4016-4028.

- [380] **Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Tschopp, J.** (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors.
Nature: **386**, (6624) 517-521.
- [381] **Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y.** (1998): Caspases: enemies within.
Science: **281**, (5381) 1312-1316.
- [382] **Tian, J., Atkinson, M. A., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Forsthuber, T., Lehmann, P. V., and Kaufman, D. L.** (1996): Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes.
The Journal of Experimental Medicine: **183**, (4) 1561-1567.
- [383] **Tian, J., Chau, C., and Kaufman, D. L.** (1998): Insulin selectively primes Th2 responses and induces regulatory tolerance to insulin in pre-diabetic mice.
Diabetologia: **41**, (2) 237-240.
- [384] **Tisch, R. and McDevitt, H.** (1996): Insulin-dependent diabetes mellitus.
Cell: **85**, (3) 291-297.
- [385] **Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., and Sharpe, A. H.** (1995): Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4.
Immunity: **3**, (5) 541-547.
- [386] **Todryk, S., Melcher, A. A., Hardwick, N., Linardakis, E., Bateman, A., Colombo, M. P., Stoppacciaro, A., and Vile, R. G.** (1999):

Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake.

The Journal of Immunology: **163**, (3) 1398-1408.

- [387] **Tonks, N. K., Charbonneau, H., Diltz, C. D., Fischer, E. H., and Walsh, K. A.** (1988): Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase.

Biochemistry: **27**, (24) 8695-8701.

- [388] **Tough, D. F. and Sprent, J.** (1994): Turnover of naive- and memory-phenotype T cells.

The Journal of Experimental Medicine: **179**, (4) 1127-1135.

- [389] **Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H. G., Foster, L., and Karre, K.** (1989): Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides.

Nature: **340**, (6233) 443-448.

- [390] **Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H.** (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.

Science: **245**, (4915) 301-305.

- [391] **Trubiani, O., Pieri, C., Rapino, M., and Di Primio, R.** (1999): The c-myc gene regulates the polyamine pathway in DMSO-induced apoptosis.

Cell Proliferation: **32**, (2-3) 119-129.

- [392] **Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M.** (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma.

Science: **228**, (4706) 1440-1443.

- [393] **Turka, L. A., Ledbetter, J. A., Lee, K., June, C. H., and Thompson, C. B.** (1990): CD28 is an inducible T cell surface antigen that

transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes.

The Journal of Immunology: **144**, (5) 1646-1653.

- [394] **Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., and Mellman, I.** (2000): Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*: **288**, (5465) 522-527.
- [395] **van Crevel, R., van der Ven-Jongekrijg, J., Netea, M. G., de Lange, W., Kullberg, B. J., and van der Meer, J. W.** (1999): Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *Journal of Immunological Methods*: **222**, (1-2) 145-153.
- [396] **van Kooten, C. and Banchereau, J.** (2000): CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*: **67**, (1) 2-17.
- [397] **Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F. W., Willerford, D. M., and Abbas, A. K.** (1997): Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. *The Journal of Immunology*: **158**, (8) 3738-3745.
- [398] **Van Parijs, L., Peterson, D. A., and Abbas, A. K.** (1998): The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens. *Immunity*: **8**, (2) 265-274.
- [399] **Vance, J. E. and Vance, D. E.** (1988): Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *Journal of Biological Chemistry*: **263**, (12) 5898-5909.
- [400] **Veis, D. J., Sentman, C. L., Bach, E. A., and Korsmeyer, S. J.** (1993): Expression of the Bcl-2 protein in murine and human

thymocytes and in peripheral T lymphocytes.

The Journal of Immunology: **151**, (5) 2546-2554.

- [401] **Verhoven, B., Schlegel, R. A., and Williamson, P.** (1995): Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.
The Journal of Experimental Medicine: **182**, (5) 1597-1601.
- [402] **Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C.** (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.
Journal of Immunological Methods: **184**, (1) 39-51.
- [403] **Vitali, C., Bombardieri, S., Moutsopoulos, H. M., Balestrieri, G., Bencivelli, W., Bernstein, R. M., Bjerrum, K. B., Braga, S., Coll, J., and de Vita, S.** (1993): Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community.
Arthritis & Rheumatism: **36**, (3) 340-347.
- [404] **Vremec, D. and Shortman, K.** (1997): Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes.
The Journal of Immunology: **159**, (2) 565-573.
- [405] **Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D. J., Ardavin, C. F., Wu, L., and Shortman, K.** (1992): The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells.
The Journal of Experimental Medicine: **176**, (1) 47-58.

- [406] **Wagner, U. G., Kurtin, P. J., Wahner, A., Brackertz, M., Berry, D. J., Goronzy, J. J., and Weyand, C. M.** (1998): The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis.
The Journal of Immunology: **161**, (11) 6390-6397.
- [407] **Waldrop, S. L., Pitcher, C. J., Peterson, D. M., Maino, V. C., and Picker, L. J.** (1997): Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency.
The Journal of Clinical Investigation: **99**, (7) 1739-1750.
- [408] **Wegener, A. M., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F., and Malissen, B.** (1992): The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules.
Cell: **68**, (1) 83-95.
- [409] **Weinberg, A. D., Wegmann, K. W., Funatake, C., and Whitham, R. H.** (1999): Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis.
The Journal of Immunology: **162**, (3) 1818-1826.
- [410] **Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D., and Stobo, J.** (1984): Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: **81**, (13) 4169-4173.
- [411] **Weyand, C. M.** (2000): New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis.
Rheumatology: **39 Supplement 1**, 3-8.

- [412] **Weyand, C. M. and Goronzy, J. J.** (1997): The molecular basis of rheumatoid arthritis.
Journal of Molecular Medicine: **75**, (11-12) 772-785.
- [413] **Weyand, C. M., McCarthy, T. G., and Goronzy, J. J.** (1995): Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis.
The Journal of Clinical Investigation: **95**, (5) 2120-2126.
- [414] **Williams, A., Peh, C. A., and Elliott, T.** (2002): The cell biology of MHC class I antigen presentation.
Tissue Antigens: **59**, (1) 3-17.
- [415] **Winoto, A., Urban, J. L., Lan, N. C., Goverman, J., Hood, L., and Hansburg, D.** (1986): Predominant use of a V alpha gene segment in mouse T-cell receptors for cytochrome c.
Nature: **324**, (6098) 679-682.
- [416] **Wong, F. S. and Janeway, C. A. J.** (1999): The role of CD4 vs. CD8 T cells in IDDM.
Journal of Autoimmunity: **13**, (3) 290-295.
- [417] **Wu, L. C., Tuot, D. S., Lyons, D. S., Garcia, K. C., and Davis, M. M.** (2002): Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC.
Nature: **418**, (6897) 552-556.
- [418] **Wucherpfennig, K. W. and Strominger, J. L.** (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein.
Cell: **80**, (5) 695-705.
- [419] **Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., and Baltimore, D.** (1997): Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and

apoptosis.

Cell: **89**, (7) 1067-1076.

- [420] **Yellin, M. J., Lee, J. J., Chess, L., and Lederman, S.** (1991): A human CD4- T cell leukemia subclone with contact-dependent helper function.
The Journal of Immunology: **147**, (10) 3389-3395.
- [421] **Yokochi, T., Holly, R. D., and Clark, E. A.** (1982): B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas.
The Journal of Immunology: **128**, (2) 823-827.
- [422] **Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M.** (1989): A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.
The Journal of Experimental Medicine: **169**, (5) 1747-1756.
- [423] **Zehner, M., Szodoray, P., Gyimesi, E., and Szondy, Z.** (1999): Correlation of increased susceptibility to apoptosis of CD4+ T cells with lymphocyte activation and activity of disease in patients with primary Sjogren's syndrome.
Arthritis & Rheumatism: **42**, (8) 1673-1681.
- [424] **Zekzer, D., Wong, F. S., Ayalon, O., Millet, I., Altieri, M., Shintani, S., Solimena, M., and Sherwin, R. S.** (1998): GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice.
The Journal of Clinical Investigation: **101**, (1) 68-73.
- [425] **Zeng, Z., Castano, A. R., Segelke, B. W., Stura, E. A., Peterson, P. A., and Wilson, I. A.** (1997): Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove.
Science: **277**, (5324) 339-345.

- [426] **Zimmermann, C., Prevost-Blondel, A., Blaser, C., and Pircher, H.** (1999): Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences.
European Journal of Immunology: **29**, (1) 284-290.
- [427] **Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X.** (1997): Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.
Cell: **90**, (3) 405-413.

7 Anhang

Sequenz der humanen GAD mit den verwendeten Peptiden

1 MASP GSGFWS FGSE DGSGDS ENPG TARAWC QVAQKFTGGI GNKLCALLYG

51 DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC SCSKV|**DVNYA FLHATDLLPA**
GP01

101 **CDGER|PTLAF LQDVMNILLQ YVVK**|FDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA
GP02

151 DQPQNLEEIL MHCQTTLKYA IKTGH|**PRYFN QLSTGLDMVG LAADW**|LTSTA
GP03

201 NTNMF TYEIA PVFVLLEYVT LKKMREIIGW PGGSG|**DGIFS PGGAISNMYA**
GP04

251 **MMIAR|FKMFP EVKEK|GMAAL PRLIAFTSEH SHFSL**|KKGAA ALGIG|**TDSVI**
GP05

301 **LIKCDER GKM IPSDL**|ERRIL EAKQKG FVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV
GP06

351 ADICKKYKIW MHVDAAWGGG LLMSR|**KHKWK LSGVERANSV TWNPH**|KMMGV
GP07

401 PLQCSALLVR EEGLM|**QNCNQ MHASYLFQOD KHYDL**|SYDTG DKALQCGRHV
GP08

451 DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLELA EY LYNIIKNREG YEMVFDGKPQ

501 HTNVC|**FWYIP PSLRTLEDNE ERMSR**|LSKVA PVIKA|**RMMEY GTTMVSYQPL**
GP09 GP10

551 **GDKVN|FFRMV ISNPAATHQD IDFLI**|EEIER LGQDL
GP11

Sequenz des bakteriellen Tetanustoxins (leichte und schwere Kette) mit den verwendeten Peptiden

1 RIPITINNFR YSVPVNNDTI IMMEPPYCKG LDIYYKAFKI TDRIWIVPER

51 YEEGTPKPEDF NPPSSLIEGA SEYYDPNYLR TDSDKDRFLQ TMVKLFNRIK

101 NNVAGEALLD KIINAIPYLG NSYSLLDKFD TNSNSVSFNL SEQDPSGATT

151 KSAMLTSLII FGP GPVLNKN EVRGIVLRVD NKNYFPCRDG FGSIMQMTFC

201 PEYIPTFDNV IENITSLTIG KSKYFQDPAL LLMHELIHVL HGLYGMQVSS

251 HEIIPSKQEI YMQHTYPISA E|**ELFTFGGQD ANLISIDIKN D**|LYEKTLDNDY
TTP3

301 KAIANKLSQV TSCNDPNIDI DSYKQIYQQK YQFDKDSNGQ YIVNEDKFQI

351 LYNSIMYGFT EIELGKKFNI KTRLSYFSMN HDPVKIPNLL DDTIYNDTEG

401 FNIESKDLKS EYKGQNM RVN TNAFRNVDGS GLVSKLIGLC KKIIPPTNIR

451 ENLYNRTA**AL** TDLGGELCIK IKNEDLIFIA EKNSFSEEPF QDEIVSYNTK
BEGINN DER H-CHAIN

501 NKPLNFNYSL DKIIILDYNLQ SKITLPNDRT TPVTKGIPYA PEYKSNAAST

551 IEIHNIDDNT IYQYLYAQKS P TTLQRITMT NSVDDALI|**NS TKIYSYFPSV**
TTP4

601 **ISKVNQGA**|QG ILFLQWVRDI IDDFTNESQ KTT|**IDKISDV STIVPYIGPA**
TTP1

651 **LNI**|VKQGYEG NFIGALET TG VVLLLEYIPE ITLPVIAALS IAESSTQKEK

701 IIKTIDNFLE KRYEKWIEVY KLVKAKWLGT VNTQFQKRSY QMYRSLEYQV

751 DAIKKIIDYE YKIYSGPDKE QIADEINN LK NKLEEKANKA MININIFMRE

801 SSRSFLVNQM INETKKQLLE FDTQSKNILM QYIKANSKFI GITELKKLES

851 KINKVFSTPI PFSYSKNLDC WVDNEEDIDV ILKKSTILNL DINNDIISDI
901 SGFNSSVITY PDAQLVPGIN GKAIHLVNNE SSEVIVHKAM DIEYNDMF|**NN**
951 **FTVSFWLRVP KVSASHLE**|QY DTNEYSIISS MKKYSLSIGS GWSVSLKGNN
TTP2
1001 LIWTLKDSAG EVRQITFRDL SDKFNAYLAN KWVFITITND RLSSANLYIN
1051 GVLMGSAEIT GLGAIREDDN ITLKLDRCNN NNQYVSIDKF RIFCKALNPK
1101 EIEKLYTSYL SITFLRDFWG NPLRYDTEYY LIPVAYSSKD VQLKNITDYM
1151 YLTNAPSYTN GKLNIYYRRL YSGLKFIIKR YTPNNEIDSF VRSGDFIKLY
1201 VSYNNNEHIV GYPKDGNAFN NLDRLRVGY NAPGIPLYKK MEAVKLRLDK
1251 TYSVQLKLYD DKDASLGLVG THNGQIGNDP NRDILIASNW YFNHLKDKTL
1301 TCDWYFVPTD

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geholfen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerd Schmitz für die vielfältigen Möglichkeiten, die interessanten Themen und die zahlreichen Ideen zur Realisierung meiner Doktorarbeit am Institut für Klinische Chemie. Herrn Prof. Dr. Georg Löffler danke ich für seine Bereitschaft die Gutachterschaft für die Naturwissenschaftliche Fakultät III zu übernehmen.

Ich danke Herrn PD Dr. Gregor Rothe für seine geduldige Betreuung und die konstruktive Kritik.

Ich danke meinen Kollegen Frau Dr. Alexandra Pfeiffer, Frau Dr. Soha Younes, Herrn Dr. Guido Meierhoff, Herrn Dr. Michael Kapinsky, Herrn Dr. Roland Stark, Herrn Dr. Florian Kern (Charité Berlin), Herrn Dr. Josef Endl (Roche Penzberg), Frau Barbara Dreisbusch (Roche Penzberg), Frau Margot Grandl, Frau Berta Schulz-Banares, Herrn Rainer Schifferer, Herrn Bernd Lieser und Herrn Ahmed Abu-Khader für ihre Kollegialität, ihre moralische Unterstützung und die vielen Diskussionen und Anregungen.

Ich danke meinen Kollegen im Labor Frau Anna Forster-Kreutzer, Frau Dorothea Blos, Frau Edeltraud Krepler, Frau Ilse Kratochwill und Frau Gabriele Hohenester für ihre praktische Hilfe und das gute Arbeitsklima.

Ich danke allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für ihre ständige Kooperation.

Ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden für ihre moralische Unterstützung vor allem gegen Ende meiner Doktorarbeit. Und ich danke meiner Großmutter, die die Grundlage zu dieser Arbeit geschaffen hat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir nachstehend aufgeführte Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

Siehe Danksagung

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Sven Olaf Friedrich)