

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Immunbiologie der Transplantatabstoßung:  
Charakterisierung antigenspezifischer  
MHC-Klasse-II-positiver CD4+ T-Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**André Heeg**

aus Würzburg

Würzburg, August 2006

Referent: Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Herrmann  
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2007**

**Der Promovend ist Arzt**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung .....	3
1.2	Experimentelle Teilziele dieser Arbeit.....	6
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>8</b>
3.1	Peptid.....	8
3.2	Tiere.....	8
3.3	Immunisierung.....	9
3.4	Kulturmedium und Pufferlösungen .....	9
3.5	T-Zell-Proliferationsassay.....	10
3.5.1	Isolierung von Lymphknotenzellen.....	10
3.5.2	Aufreinigung von T-Lymphozyten .....	10
3.5.3	Isolierung von dendritischen Zellen .....	11
3.6	Gemischte Leukozytenreaktion .....	12
3.7	Auswertung .....	12
3.8	Zellstimulation mit PMA und Ionomycin.....	13
3.9	Blockierungsexperimente mit dem anti-CD28-Antikörper .....	13
3.10	Durchflusszytometrie.....	13
3.11	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	15
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>17</b>
4.1	Auswirkungen der Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 auf die regionalen Lymphknoten .....	17
4.2	Charakterisierung der R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>neg</sup> T-Lymphozyten .....	25
4.3	Charakterisierung der R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten .....	28
4.4	R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten als Stimulatorzellen.....	32
4.5	Nachweis der Kostimulation bei R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten .....	34
<b>5</b>	<b>BEANTWORTUNG DER FRAGEN</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>42</b>
6.1	Antigenspezifische T-Lymphozyten lassen sich in MHC-Klasse-II-positive und -negative Zellen unterteilen .....	42
6.2	Die antigenspezifischen R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup> T-Lymphozyten aktivieren T-Lymphozyten .....	46
<b>7</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>57</b>

## **Abkürzungen**

- APC: antigen presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)
- DC: dendritic cells (dendritische Zellen)
- FACS: fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometer)
- LEW: Lewis Ratte
- LNC: lymph node cells (Lymphknotenzellen)
- MHC: major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
- PBS: phosphate buffered saline
- pLNC: popliteale lymph node cells (popliteale Lymphknotenzellen)
- TCR: T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
- WF: Wistar-Furth Ratte

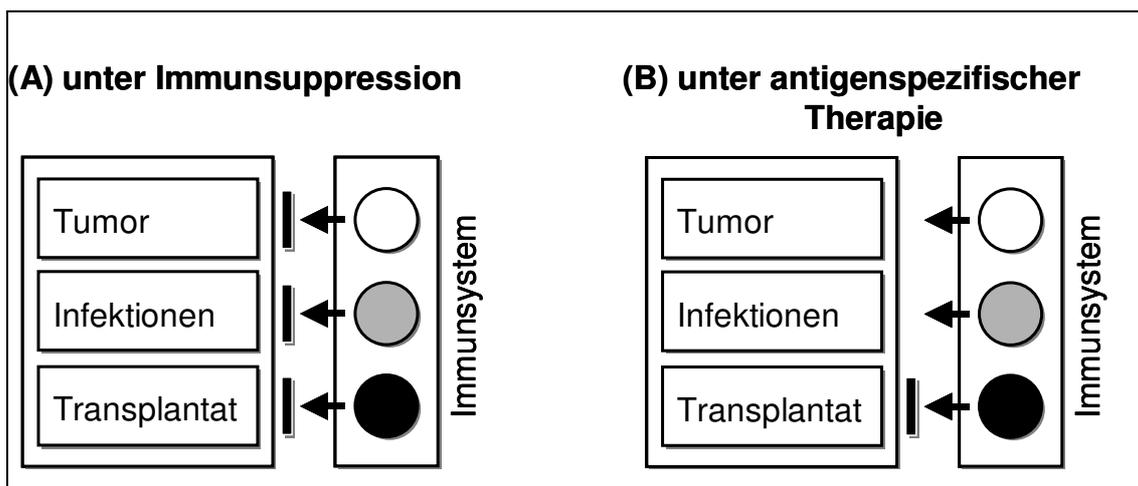
## 1 Einleitung

Die klinische Organtransplantation hat sich weltweit zu einem erfolgreichen Therapieverfahren für irreversibel geschädigte Organe entwickelt (Hariharan S et al., 2000). Zu der beeindruckenden chirurgischen Leistung, die Organtransplantation auf höchstem technischen Stand routinemäßig in zahlreichen Zentren durchzuführen, und den Fortschritten in der Organkonservierung sowie Gewebetypisierung, führte ohne Zweifel der Einsatz von Immunsuppressiva im Wesentlichen zum Erfolg der Transplantationsmedizin.

Die Schwächung des Immunsystems mit Immunsuppressiva ist notwendig, um die lebenswichtige Transplantatfunktion zu erhalten. Solche Substanzen sind in der Lage, die durch das Transplantat ausgelöste Immunantwort, die auch unter der Bezeichnung Transplantatabstoßung bekannt ist, effektiv zu hemmen. In den letzten 40 Jahren sind zahlreiche Immunsuppressiva erfolgreich in die Klinik eingeführt worden. Als Mono- oder Kombinationstherapie haben sie die Ergebnisse zur Transplantat-Kurzzeitfunktion erheblich gesteigert. So liegt das aktuelle 1-Jahres-Transplantatüberleben für Niere, Herz, Leber, Lunge und Pankreas in den meisten Transplantationszentren zwischen 80 und 90% (Denton MD et al., 1999).

Doch die von diesen Immunsuppressiva ausgehenden Risiken sind für den Patienten nicht unerheblich: Die Anfälligkeit gegenüber Infektionen und das Risiko der Tumorentstehung ist bei immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Bevölkerung statistisch signifikant erhöht (Fishman JA und Rubin RH, 1998; Rubin RH, 1998; Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH, 1998). Auch Daten von *Eurotransplant*, der gemeinnützigen Organisation zum Austausch von Spenderorganen auf europäischer Ebene, belegen, dass schwerwiegende Infektionen die Haupttodesursache bei Organempfängern darstellen ([www.eurotransplant.nl](http://www.eurotransplant.nl)).

Zu der gegenwärtigen klinischen Strategie, die Nebenwirkungen der Immunsuppression ohne Minderung ihrer Wirksamkeit zu mildern<sup>\*)</sup> (Ratcliffe PJ et al., 1996), z.B. durch Absetzen oder "Ausschleichen" der Kortikosteroide (Woodle ES et al., 2005), besteht ein wissenschaftliches Hauptziel unverändert weiter, nämlich die im Tiermodell erfolgreichen antigenspezifischen Konzepte so zu optimieren, dass sie auch in der Klinik angewendet werden können (Shakhar G et al., 2005). Auch wenn die fortschreitende Abstoßung ein multizelluläres Geschehen darstellt, so kommt doch den alloreaktiven CD4+ T-Lymphozyten eine besondere Bedeutung bei der Initiierung der Abstoßung zu (Rogers NJ und Lechler RI, 2001). Sie stellen damit ein wesentliches Ziel für antigenspezifische Therapiekonzepte dar, um ausschließlich die an der Transplantatabstoßung beteiligten immunologischen Abwehrmechanismen zu hemmen (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1:** Darstellung der immunologischen Situation nach Organtransplantation unter (A) Immunsuppression und (B) einer antgenspezifischer Therapie. Immunsuppressiva schützen zwar das Transplantat vor der Abstoßung, doch hierzu hemmen sie die lebenswichtige Immunabwehr. In einem nicht-immunsupprimierten Organismus schützt die Immunabwehr vor Infektionen und Tumoren. Das Ziel einer antgenspezifischer Therapie ist es daher, nur die gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort zu hemmen, ohne dabei das gesamte Immunsystem zu beeinflussen. So bleibt die lebenswichtige Immunabwehr erhalten. Ziel solcher antgenspezifischer Therapien sind in erster Linie die alloreaktiven CD4+ T-Lymphozyten (s. auch Text).

---

\* Zu diesem umfangreichen Themenkomplex gehört auch, welche Rolle die hoch wirksamen Basisimmunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus aus der Familie der Calcineurin-Inhibitoren in neuen Therapiekonzepten spielen werden (z.B. Wong W et al., 2005).

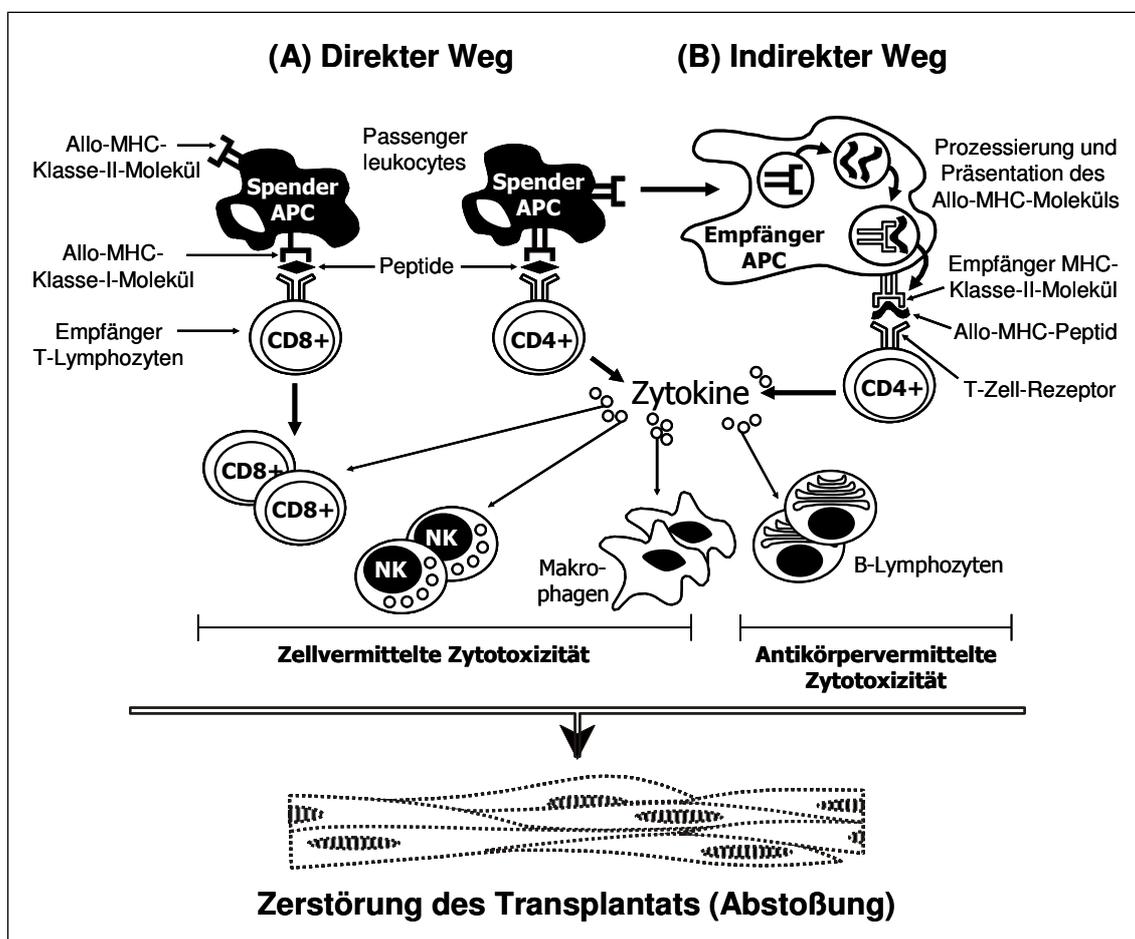
Die alloreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten werden in erster Linie durch die so genannten Transplantat- oder Alloantigene aktiviert; hierunter werden vor allem die hochpolymorphen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes ("*major histocompatibility complex*" oder MHC) zusammengefasst (Bjorkman PJ et al., 1987). Die Funktion der alloreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten besteht darin, verschiedene Effektorzellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen zu aktivieren, die sich ihrerseits an der als Transplantatabstoßung bezeichneten Gewebeerstörung beteiligen (Rogers NJ und Lechler RI, 2001).

### **1.1 Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung**

Die klinische Organtransplantation stellt in aller Regel eine allogene Transplantation dar. Hierunter wird die Übertragung von Organen, Geweben oder Zellen zwischen genetisch nicht-identischen Individuen der gleichen Spezies verstanden. Hiervon abzugrenzen ist die syngene und xenogene Transplantation (Otto C und Ulrichs K, 2004). Nach allogener Transplantation stellen die fremden oder alloenen MHC-Moleküle, und zwar sowohl Moleküle der MHC-Klasse-I und Klasse-II, das Hauptziel der Immunantwort dar (Rogers NJ und Lechler RI, 2001). Diese Moleküle, die sowohl auf den Zellen des Organtransplantates als auch den "passenger leukocytes" (s. unten) zu finden sind, stellen die "stärksten" Antigene nach einer Transplantation dar. Da sie bei Transplantationsexperimenten entdeckt wurden, werden sie auch als Transplantationsantigene bezeichnet. Ihre eigentliche Funktion, nämlich T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren, wurde erst viel später durch Rolf Zinkernagel und Peter Doherty beschrieben (Zinkernagel R und Doherty P, 1974).

Alloreaktive T-Lymphozyten über zwei unterschiedliche Wege aktiviert: dem direkten und dem indirekten Weg der Alloantigenerkennung (Lechler RI und Batchelor JR, 1982). Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Wegen (Abb. 1.2) ist der, dass beim direkten Weg die alloreaktiven T-Lymphozyten des Empfängers durch so genannte "passenger leukocytes" aktiviert werden. Hierbei handelt es sich in erster Linie um antigenpräsentierende Zellen, die mit dem

Organtransplantat in den Empfänger übertragen werden, um von dort aus in die verschiedenen lymphatischen Organe auszuwandern. Dort erkennen die alloreaktiven T-Lymphozyten, sowohl CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup>, des Empfängers die allogenen MHC-Klasse-I bzw. Klasse-II Moleküle auf der Zelloberfläche dieser "passenger leukocytes" und werden hierdurch aktiviert. Dieses unter dem Begriff Alloreaktivität bekannte Phänomen wird mit der Kreuzreaktivität der T-Zellrezeptoren auf alloreaktiven T-Lymphozyten erklärt (Ben-Nun A et al., 1983; Liu Z et al., 1993; Heeger PS, 2003).



**Abbildung 1.2:** Die beiden Wege zur Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten des Empfängers nach allogener Transplantation: Der direkte (A) und indirekte (B) Weg der Alloantigenerkennung. Der direkte Weg ist durch die Interaktion antigenpräsentierender Zellen (APC) aus dem Transplantat (Spender-APC; siehe auch Text) mit den Empfänger-T-Lymphozyten charakterisiert. Hierdurch werden CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktiviert. Beim indirekten Weg nehmen Empfänger-APC verschiedenste allogene Proteine auf, hierunter befinden sich auch Proteine des MHC-Komplexes, und prozessieren diese in Peptide, die anschließend, gebunden an Selbst-MHC-Klasse-II-Molekülen, an die Zelloberfläche transportiert und den eigenen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert werden.

Der indirekte Weg der Alloantigenerkennung wird durch antigenpräsentierende Zellen des Transplantat-Empfängers vermittelt. Hierzu ist es notwendig, dass diese Zellen verschiedenste allogene Proteine, hierunter befinden sich auch Proteine des MHC-Komplexes, aufnehmen, diese zu Peptiden prozessieren, um sie in Selbst-MHC-Klasse-II Molekülen auf der Zelloberfläche den eigenen CD4+ T-Lymphozyten zu präsentieren (Auchincloss H et al., 1993; Auchincloss H und Sultan H, 1996). Durch Zytokine steuern die aktivierten CD4+ T-Lymphozyten weitere Effektorzellen, die ihrerseits an der Transplantatabstoßung aktiv beteiligt sind (Abb. 1.2).

Der indirekte Weg lässt sich *in vitro* im T-Zellproliferationsassay nachweisen. Der für diese Arbeit sehr wichtige Assay basiert auf folgenden Elementen: Die durch Immunisierung induzierten antigenspezifischen CD4+ T-Lymphozyten werden isoliert und *in vitro* mit syngenen dendritischen Zellen, die zuvor mit dem gleichen Antigen beladen wurden, inkubiert. Die Restimulation der antigenspezifischen T-Lymphozyten wird über den Einbau von radioaktivem Thymidin gemessen. Dieser Assay ist streng antigenspezifisch und beruht auf dem immunologischen "Gedächtnis" der T-Lymphozyten; "naive" T-Lymphozyten werden in diesem Assay nicht aktiviert. Als Modellantigen wurde das allogene, immundominante Peptidantigen P1 verwendet, das in Lewis-Ratten eine starke Immunantwort induziert. Von Bedeutung ist, wie Untersuchungen der eigenen Gruppe zeigen, dass P1-spezifische T-Lymphozyten die Abstoßung von Organtransplantaten, die von Wistar Furth-Ratten stammen, fördern (Sitaru AG et al., 2002). Auch wurde in diesem Peptid der Einfluss einzelner Aminosäuren untersucht, in denen sich das MHC-Klasse-II Molekül von Wistar Furth und Lewis unterscheiden (Sitaru AG et al., 2004). Mit P1 ist es möglich, MHC-Klasse-II-Moleküle von außen, ohne zusätzliche Prozessierung, zu beladen.

## **1.2 Experimentelle Teilziele dieser Arbeit**

Die Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um eine T-Zell-spezifische Immunantwort auszulösen. Dies ist jedoch nicht der einzige Weg. So belegen Literaturdaten, dass auch aktivierte T-Lymphozyten in der Lage sind, als antigenpräsentierende Zellen zu agieren (Broeren CPM et al., 1995). Dieses Phänomen wird als Autostimulation bezeichnet, wobei seine Wirkung auf die Immunantwort, ob aktivierend oder inhibierend, im Detail nicht verstanden ist.

Stefan Kottenmeier zeigte in seiner Inaugural-Dissertation, dass für die Autostimulation MHC-Klasse-II-positive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten verantwortlich sind, die durch Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 induziert wurden (Kottenmeier S, 2005). Das experimentelle Konzept der vorliegenden Arbeit sollte deshalb klären, ob alle antigenspezifischen T-Lymphozyten zur Autostimulation befähigt sind und welche weiteren Voraussetzungen, neben der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, hierfür erfüllt sein müssen. Als Referenz wurden "reife" dendritische Zellen aus der Milz eingesetzt.

Die beiden Teilziele dieser Arbeit, zu denen die entsprechenden Fragen im nächsten Abschnitt aufgelistet sind, waren somit:

- I. Identifizierung der durch Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 induzierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten.
- II. Charakterisierung dieser Zellen hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Eigenschaften im T-Zellproliferationsassay sowie der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und Molekülen zur Kostimulation.

## 2 Fragestellung

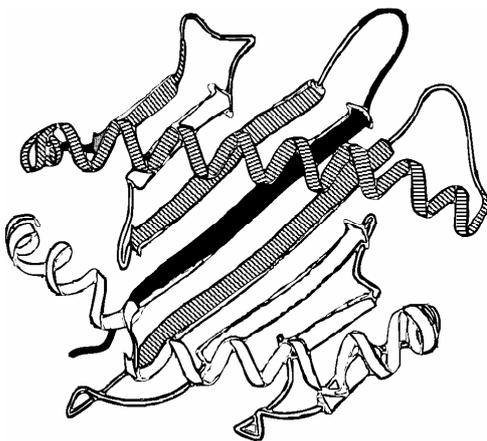
Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung antigenspezifischer MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten. Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Die subkutane Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 führt zur Aktivierung des Immunsystems von Lewis-Ratten. Welche Auswirkungen sind im Detail zu beobachten?
2. Welche Besonderheiten zeigen die P1-spezifischen T-Lymphozyten im T-Zellproliferationsassay?
3. Nach der Immunisierung mit P1 sind antigenspezifische  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten nachzuweisen.
  - a) Welche Eigenschaften weisen diese Zellen im T-Zellproliferationsassay auf?
  - b) Welche molekularbiologischen Charakteristika zeigen sie?
4. Antigen-spezifische  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten sind nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 in den poplitealen Lymphknoten zu finden. Worin unterscheiden sie sich von den ebenfalls nach Immunisierung mit P1 in den Lymphknoten entstehenden  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Peptid

Das in dieser Arbeit verwendete synthetische Peptid P1 gehört zu einer Gruppe von sieben Wistar-Furth (WF) MHC-Klasse-I (RT1.A<sup>u</sup>) Peptiden, deren Immunogenität bereits in früheren Arbeiten untersucht wurde (Sitaru et al., 2002). P1, das von der Firma Jerini AG in Berlin mit einer Reinheit von 95% synthetisiert wurde, induziert eine besonders starke Immunantwort in Lewis-Ratten. Die Abbildung 3.1 zeigt die Position von P1 im WF-MHC-Klasse-I-Molekül; P1 ist 19 Aminosäuren lang.



**Abb. 3.1:** Der extrazelluläre Bereich des MHC-Klasse-I Moleküls mit der Peptidbindungstasche. Das Antigen P1 „entstammt“ dem ersten  $\beta$ -Faltblatt der  $\alpha$ 1-Domäne (schwarz unterlegt).

### 3.2 Tiere

Verwendet wurden 8-12 Wochen alte männliche Lewis- (LEW, RT1<sup>l</sup>) und Wistar-Furth- (WF, RT1<sup>u</sup>) Ratten mit einem Gewicht von 150-250 g. Die beiden Inzucht-Rattenstämme wurden von den Firmen Charles River GmbH Deutschland, 97633 Sulzfeld ([www.criver.com](http://www.criver.com)), und Harlan-Winkelmann GmbH Deutschland, 33178 Borcheln ([www.harlan-winkelmann.de](http://www.harlan-winkelmann.de)) gezüchtet.

### **3.3 Immunisierung**

Zur Immunisierung wurden 12,5 µl Peptid einer 1 mg/ml-Stammlösung (lyophilisiertes Peptid in PBS gelöst und aliquotiert) mit 12,5 µl Adjuvans (TiterMax, Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland) in einer Insulinspritze mit integrierter Kanüle (Omnican, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland) auf dem *Vortexer* gemischt. Die Emulsion wurde sofort Lewis-Ratten subkutan in die Sohlen der Hinterfüße zu gleichen Teilen injiziert. Vor jeder Immunisierung wurden die Tiere mit Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert. Sieben Tage nach Immunisierung wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen.

### **3.4 Kulturmedium und Pufferlösungen**

#### **Kulturmedium**

Das Standard-Kulturmedium RPMI 1640 wurde ergänzt mit (alle Angaben als Endkonzentration): 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L Natrium-Pyruvat, 2 mmol/L L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µmol/L 2-Mercaptoethanol, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 10% fetales Kälberserum (CellConcepts, Umkirch, Deutschland; alle weiteren Reagenzien von Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

#### **Lysepuffer (10-fach konzentriert)**

Der Puffer zum Lysieren von Erythrozyten bestand aus 1,68 mmol/L Ammoniumchlorid, 99,88 mmol/L Kaliumhydrogencarbonat und 12,6 mmol/L EDTA. Der 10-fach konzentrierte Puffer wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

#### **PBS (Phosphate buffered saline)**

PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 enthielt 140 mmol/L Natriumchlorid, 2,7 mmol/L Kaliumchlorid, 7,2 mmol/L Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 1,47 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat.

#### **3.5 T-Zell-Proliferationsassay**

Der T-Zell-Proliferationsassay wurde in Zellkultur-Mikroplatten mit 96 Rundboden-Vertiefungen (96-"well"-Rundbodenplatten) von Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland, durchgeführt. Popliteale Lymphknotenzellen (jeweils  $10^5$  Zellen pro Vertiefung) wurden ohne weitere Aufreinigung mit 20 Gray bestrahlten syngenen dendritischen Zellen ( $10^4$  Zellen pro Vertiefung) und 5  $\mu\text{g}$  Peptid P1 pro Vertiefung (= 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in einem Endvolumen von jeweils 150  $\mu\text{l}$  inkubiert. Die Platten wurden für 3 Tage bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$ -Sättigung kultiviert. Die letzten 6 Stunden wurden die Zellen mit 0,5  $\mu\text{Ci}/\text{Vertiefung}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin inkubiert ("gepulst"). Der [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Einbau wurde mit einem "β-plate"-Szintillationsmeßgerät in der Einheit "counts per minute" (cpm) bestimmt (Institut für Virologie und Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg).

##### **3.5.1 Isolierung von Lymphknotenzellen**

Sieben Tage nach Immunisierung mit dem Peptid P1 wurden die poplitealen Lymphknoten aus der Lewis-Ratte steril entnommen und die Lymphknotenzellen isoliert. Hierzu wurden die Lymphknoten durch ein Sieb ("Cell Strainer" von Falcon, Porengröße: 70  $\mu\text{m}$ , über die Firma Noras, Würzburg, bezogen) gepresst, die Zellsuspension aufgefangen und die Zellen zweimal "gewaschen" (d.h. sie wurden abzentrifugiert, und das Zellpellet erneut in PBS oder Kulturmedium resuspendiert). Zum Abschluss wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt, um sie auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml RPMI 1640 einzustellen. Zum Auszählen wurden die Zellen mit 0,04% Trypanblau (Endkonzentration) gemischt.

##### **3.5.2 Aufreinigung von T-Lymphozyten**

In einem weiteren Schritt wurden die T-Lymphozyten aus den Lymphknotenzellen (Abschnitt 3.5.1) aufgereinigt. Hierzu wurde der Anteil der T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Pro  $1 \times 10^6$  Zielzellen wurden 0,3  $\mu\text{g}$  des anti-

TCR  $\alpha/\beta$ -Antikörpers R73 (Tab. 3.1) eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und erneut auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml RPMI 1640 eingestellt. Pro Zielzelle wurden 2 Dynabeads (DYNAL, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt und bei 4°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die an den Dynalbeads haftenden T-Lymphozyten mit einem Magneten von den übrigen Zellen getrennt und in 200  $\mu$ l Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Bindung zwischen Zellen und Dynabeads mit 5  $\mu$ l DNAse (Stammlösung: 50 U/ $\mu$ l) gelöst (15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur) und die Dynalbeads mit einem Magneten entfernt. Die so isolierten R73-positiven T-Lymphozyten wurden gewaschen und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Aufreinigung der MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten aus den R73-positiven T-Lymphozyten erforderte einen weiteren Selektionsschritt mit dem anti-RT1.B-Antikörper Ox6.

#### **3.5.3 Isolierung von dendritischen Zellen**

Dendritische Zellen aus Milzen unbehandelter Lewis-Ratten wurden als antigenpräsentierende Zellen verwendet. Hierzu wurden die Milzen aseptisch entnommen, durch ein Sieb ("Cell Strainer", siehe oben) gepresst und die so gewonnenen Zellen mit Kulturmedium "gewaschen" (siehe oben). Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Pellet mit 10 ml 10-fach verdünntem Lysepuffer resuspendiert und nach einer 5-minütigen Inkubation die Zellsuspension durch ein weiteres Zellsieb filtriert, um Gewebefragmente aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640 "gewaschen" und über Nacht bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro Petrischale mit 15 ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden gesammelt, auf 14,5% Metrizamid (Cedarline, Kanada, über Linaris, Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland, bezogen) überführt und 13 Minuten bei 1.823 xg und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Die auf dem Metrizamid angereicherten dendritischen Zellen wurden vorsichtig entnommen, gewaschen und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Vor ihrer Verwendung als antigenpräsentierende Zellen wurden sie mit 20 Gray eines Gammestrahlens

bestrahlt (Institut für Strahlenkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg). Mit dieser Methode erhielt pro Milz durchschnittlich  $1,5 \times 10^6$  dendritische Zellen (n=31).

#### **3.6 Gemischte Leukozytenreaktion**

In der so genannten gemischten Leukozytenreaktion ("*mixed leukocyte reaction*" oder MLR) wurden dendritische Zellen ( $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung) aus Milzen unbehandelter Lewis-Ratten mit Lymphknotenzellen ( $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung), isoliert aus unbehandelten Wistar-Furth-Ratten, in einer Rundbodenplatte mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) kultiviert. Wie für den T-Zellproliferationsassay beschrieben, wurden die Platten für 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert und, zur Bestimmung der Zellproliferation, für 6 Stunden mit 0,5 µCi/well [<sup>3</sup>H]-Thymidin inkubiert (Abschnitt 3.5).

#### **3.7 Auswertung**

Die aus den Proliferationsexperimenten ermittelten Werte (wenigstens fünf Parallelwerte) in der Einheit "counts per minute" (cpm) wurden als Mittelwert und Standardabweichung mit dem Microsoft-Programm "Excel" berechnet. Bei Wiederholungen wurden alle Einzelwerte zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung herangezogen. Bei offensichtlichen Fehlmessungen (wenn der Einzelwert um mehr als 50% um den Mittelwert schwankte) wurde dieser verworfen. Bei 5 Einzelwerten wurde jedoch nicht mehr als 1 Wert gestrichen, ansonsten wurde das Experiment nicht ausgewertet. Die Kontrollen wurden mit Lymphknotenzellen aus P1-immunisierten Tieren angesetzt, um die Proliferation in Abwesenheit vom Peptid P1 und syngenen DC zu bestimmen (= "pLNC-solo"). Die Ergebnisse hierzu lagen stets um  $3.600 \pm 2.500$  cpm und sind in den Diagrammen nicht dargestellt.

#### **3.8 Zellstimulation mit PMA und Ionomycin**

Zur polyklonalen Stimulierung von T-Lymphozyten wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml Kulturmedium mit 500  $\mu\text{g/ml}$  Ionomycin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) und 10 ng/ml des Phorbolesters PMA (Sigma-Adrich, Taufkirchen, Deutschland) über Nacht bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ -Sättigung inkubiert (alle Angaben als Endkonzentration). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen.

#### **3.9 Blockierungsexperimente mit dem anti-CD28-Antikörper**

Für die Blockierungsversuche wurde der unkonjugierte anti-CD28-Antikörper JJ319, bezogen über die Firma Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland, verwendet. Jeweils  $1 \times 10^5$  Lymphknotenzellen wurden mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  und 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) im T-Zellproliferationsassay für 3 Tage bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Für die letzten 6 Stunden der Kulturvierung wurden die Zellen mit 0,5  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin pro Vertiefung versetzt ("gepulst").

#### **3.10 Durchflusszytometrie**

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu\text{l}$  PBS mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten konjugierten Maus-anti-Ratte-Antikörpern (detaillierte Beschreibung dieser Antikörper bei van den Berg et al., 2001) für 25 Minuten auf Eis inkubiert und zweimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen (6 Minuten, 402 xg, 20°C). Zur Messung wurden die Zellen mit 300  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und der Anteil an Antikörper-positiven Zellen im Durchflusszytometer (FACS-can, Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg) auf der Basis von jeweils 10.000 Ereignissen ermittelt.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension. Sie basiert auf der Messung von verschiedenen optischen Signalen,

wie das von den Zellen verursachte Streulicht und das durch gebundene, Farbstoff-konjugierte Antikörper ausgelöste Fluoreszenzlicht. Hierzu passieren die Zellen hintereinander einen Laserstrahl. Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter, FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Light Scatter, SSC) von der Granularität der Zellen abhängt. Die Möglichkeit, mit einem Durchflusszytometer Fluoreszenzlicht zu messen, erlaubt die Bestimmung einer Vielzahl von Merkmalen, wie z.B. der Nachweis verschiedenster Oberflächenmoleküle. Gängige, für die Durchflusszytometrie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe sind z.B. Fluoresceinisothiocyanat, abgekürzt FITC (Grünfluoreszenz, Emissionsmaximum bei 530 nm), oder Phycoerythrin, abgekürzt PE (Rotfluoreszenz, Emissionsmaximum bei 585 nm). Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird von verschiedenen Detektoren aufgefangen und nach Intensität und Farbe getrennt digital gespeichert. Für jede einzelne Zelle wird eine charakteristische Kombination 5 optischer Signale aufgezeichnet (FSC, SSC und bis zu 3 Fluoreszenzsignalen).

**Tabelle 3.1:** Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, ihre Spezifität und dem jeweiligen Konjugat FITC oder PE (siehe auch Text). Alle Zellproben wurden zusätzlich mittels 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien, USA) auf ihre Vitalität überprüft. Alle Antikörper wurden über Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, bezogen. TCR=T-cell receptor, T-Zellrezeptor <sup>\*)</sup>

Antikörper	Spezifität		Konjugat
	Epitop	Zielzellen	
Ox6	RT1.B	alle MHC-Klasse-II positiven Zellen	FITC
Ox8	CD8 $\alpha$	CD8+ T-Lymphozyten (in Kombination mit R73)	PE
W3/25	Domäne 1	CD4+ T-Lymphozyten (in Kombination mit R73)	PE
OX-33	CD45RB	B-Lymphozyten	FITC
OX-39	CD25	Aktivierte T-Lymphozyten	FITC
R73	$\alpha/\beta$ -TCR <sup>*)</sup>	$\alpha/\beta$ -T-Lymphozyten	PE

Die so gewonnenen digitalen Daten wurden mit dem frei erhältlichen Programm WinMDI von Joseph Trotter in der Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) statistisch und graphisch ausgewertet. Mit Excel 2002 (Microsoft) wurden die Messreihen statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Streulichtdaten wurden in linearer und die Fluoreszenzdaten in logarithmischer Skalierung dargestellt. Die graphische Auswertung einzelner Parameter erfolgt in Form von Histogrammen und die von zwei Parametern in x,-y-Diagrammen.

#### **3.11 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion ("*reversed transcriptase polymerase chain reaction*" oder RT-PCR) dient der selektiven Anreicherung bestimmter Sequenzen aus einem Gemisch verschiedener mRNA Moleküle. Hierzu werden zuerst die mRNA-Moleküle durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, aus der mit einer thermostabilen DNA-Polymerase, z.B. mit der Taq-Polymerase, die gewünschten Sequenzen spezifisch amplifiziert werden. Mit Hilfe der RT-PCR kann somit überprüft werden, welche Gene aktiv sind.

In einem ersten Schritt wurde Gesamt-RNA aus  $1 \times 10^6$  Lymphknotenzellen mit 1 ml Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die luftgetrocknete RNA wurde in 40  $\mu$ l 1 mmol/L Natriumcitratlösung (Ambion, Texas, USA) gelöst und jeweils 5  $\mu$ l für die cDNA-Synthese mit dem GeneAmp RNA-PCR-Kit von Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, eingesetzt. In einem Endvolumen von 20  $\mu$ l befanden sich: 1x PCR-Puffer II (50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3); 5 mmol/L  $MgCl_2$ , dNTP-Gemisch: 1 mmol/L; RNase-Inhibitor: 1U/ $\mu$ l; MuLV Reverse-Transkriptase: 2,5 U; d(T)<sub>16</sub> Oligonukleotide: 2,5  $\mu$ mol/L (alle Angaben als Endkonzentrationen). Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurde jeweils 5 $\mu$ l cDNA in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l eingesetzt. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten waren: 1x PCR-Puffer II; 1,5 mmol/L  $MgCl_2$ ; 2 U AmpliTaq DNA-Polymerase und jeweils 0,5  $\mu$ mol/L der entsprechenden Primer (Tab. 3.1). Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Positiv-

### 3 Material und Methoden

---

Kontrolle ("*house-keeping*" Gen) verwendet. Die Amplifikate wurden in einem 2%-igen Agarosegel (Amresco über MoBiTec GmbH Göttingen) separiert und anschließend mit dem ImageMaster UDS (Pharmacia Biotech) begutachtet und fotografiert. Sämtliche Primer wurden von MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert.

**Tabelle 3.2:** Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide ("primer"). Angabe der Produktgröße in Basenpaare oder bp, der Temperatur (Temp.) °C (= "Annealing"-Temperatur der Primer) und der Primer-Orientierung: for = forward; rev = reverse. Für jede Amplifizierung wurden jeweils 35 Zyklen durchgeführt. *Folgende Primer sind publiziert: MHC-Klasse-II Moleküle vom Haplotyp RT1 (Syha-Jedeljauser J et al. Biochim Biophys Acta 1991; 1089: 414-416), GAPDH (Kruse JJ et al., Cytokine 1999; 11: 179-185), CIITA-Promotoren (Mannie MD et al. Cellular Immunology 2004; 230: 33-43).* Die Primer für CD80 und CD86 wurden, basierend auf publizierten Sequenzen in PubMed (CD80: NM\_012926; CD86: NM\_020081), mit dem Programm "Oligo Perfect™ Designer" (www.invitrogen.com) konstruiert.

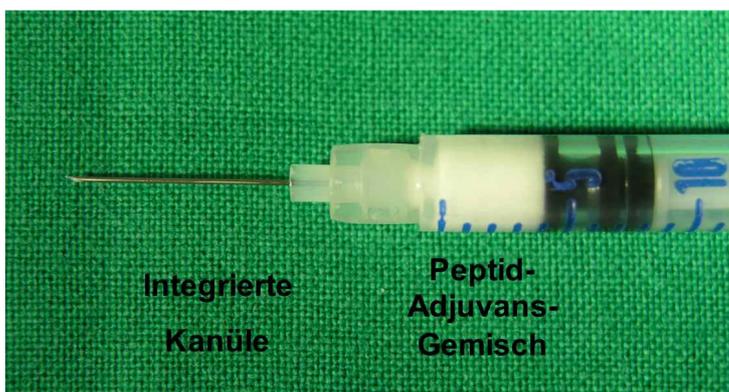
Primer		Sequenz (5'→3')	Größe (bp)	Temp.
<b>GAPDH</b>	forw	GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG	319	62
	rev	GTG AGC CCC AGC CTT CTC CAT		
<b>MHC-II</b>	for	AGC TGT GGT TGT GCT GA	517	55
	rev	CAG GAT CTG GAA GGT CCA		
<b>CD80</b>	for	TGG TGA AAC ACC TGA CCA	517	50
	rev	GTT TCT CTG CTT GCC TCA		
<b>CD86</b>	for	TGG GAA ACA GAG CTC TCA	518	53
	rev	AGG TTG ATC GAC TCG TCA		
<b>CIITA I</b>	for	GCA GAG GTT CCT GGG TCT CAC TTC AT	839	60
	rev	CGG GGA GAT CCA AAT AGT TCA GTG AGG T		
<b>CIITA III</b>	for	TGA GGC TGC CTG CTT CCC ACC TGG GCA T	620	60
	rev	CGG GGA GAT CCA AAT AGT TCA GTG AGG T		
<b>CIITA IV</b>	for	AGA GCT AGC GGC AGG GAG ACT AC	548	60
	rev	CGG GGA GAT CCA AAT AGT TCA GTG AGG T		

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Als Antigen wurde, wie bereits in der Einleitung beschrieben, das synthetische allogene Peptid P1 verwendet. Von den aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten waren in erster Linie die Eigenschaften der MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten von besonderem Interesse. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob diese Zellen in der Lage sind, wie antigenpräsentierende Zellen P1 zu präsentieren und somit als Stimulatorzellen agieren können. Neben dieser Fähigkeit zur Autostimulation wurden die Zellen auch hinsichtlich der Expression einiger Oberflächenmoleküle zur Kostimulation untersucht.

### 4.1 *Auswirkungen der Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 auf die regionalen Lymphknoten*

Antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wurden durch subkutane Injektion mit dem immundominanten Peptidantigen P1 in Lewis-Ratten induziert (s. auch Einleitung). Hierzu wurden 12,5 µl P1 (Stammlösung: 1 mg/ml) und 12,5 µl Adjuvans (TiterMax, Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland) in einer Spritze mit integrierter Kanüle gemischt (Abb. 4.1). Mit dieser Technik war es möglich, das Gemisch ohne Verlust zu injizieren und somit das Injektionsvolumen zu reduzieren.

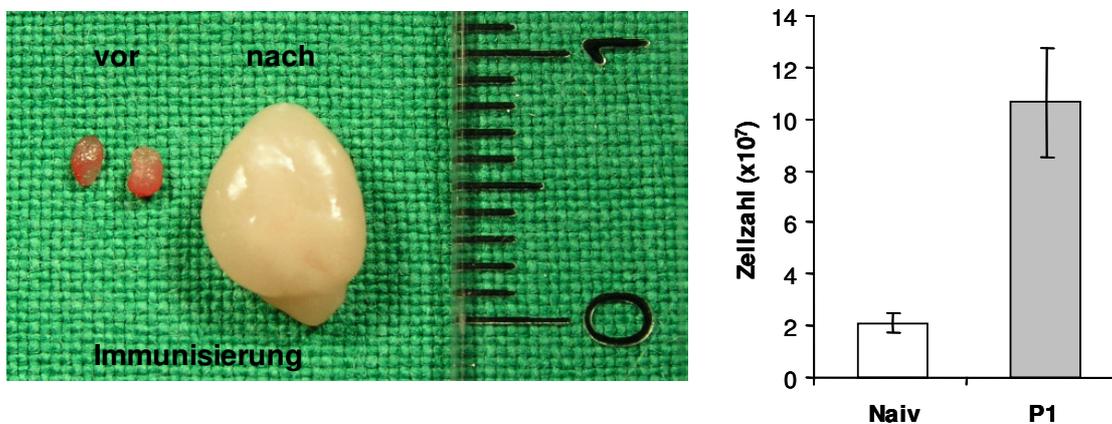


**Abb. 4.1:** Die Verwendung von Spritzen mit integrierter Kanüle (Omnican 40, 0,30x12 mm, Bestell-Nr.: 9161627) erlaubt, weil sie kein "Todvolumen" aufweisen, eine verlustfreie Injektion des Peptid-Adjuvans-Gemisches. Bestelladresse: B. Braun Petzold GmbH, D-34212 Melsungen.

## 4 Ergebnisse

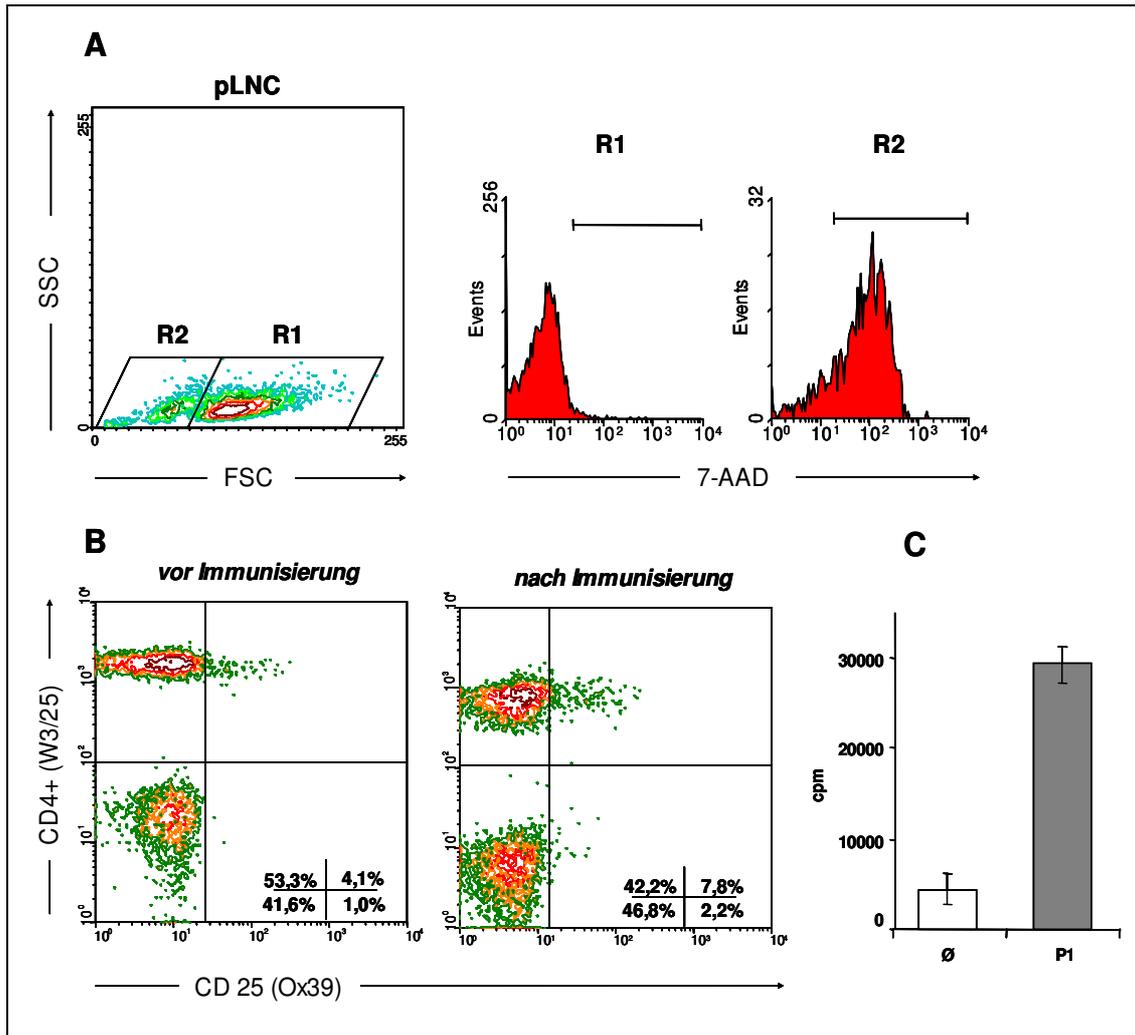
---

Sieben Tage nach Immunisierung mit P1 wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen und die isolierten Lymphknotenzellen gezählt. Auffällig war die Größenzunahme der Lymphknoten von ca. 1-1,5 mm vor Immunisierung auf ca. 6-8 mm nach Immunisierung (Abb. 4.2). Diese Größenzunahme spiegelte sich außerdem in der deutlichen Zunahme der Lymphknotenzellen auf  $10,6 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$  Zellen ( $n=13$ ) wider. Im Vergleich dazu, sind in den poplitealen Lymphknoten nicht-immunisierter Tiere durchschnittlich  $2,1 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$  Zellen ( $n=3$ ) nachzuweisen.



**Abb. 4.2:** Auswirkungen der subkutanen Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 auf die poplitealen Lymphknoten. Eine deutliche Vergrößerung der poplitealen Lymphknoten war durch die Immunisierung mit P1 zu beobachten (linke Abbildung). Diese Vergrößerung war mit einem Anstieg der Lymphozyten auf das Fünffache der ursprünglichen Zellzahl verbunden (rechte Abbildung). Mit „Naiv“ wird der Anteil isolierter Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten nicht-immunisierter Tiere bezeichnet und mit „P1“ der Anteil isolierter Lymphozyten aus poplitealen Lymphknoten P1-immunisierter Tiere. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung für 3 („naiv“) bzw. 13 („P1“) Tiere.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Lymphknotenzellen zeigte zudem, dass der Anteil an B-Lymphozyten nach Immunisierung von 11% auf 29% angestiegen war (Abb. 4.4). Für diese Untersuchungen wurden ausschließlich die lebenden Lymphozyten untersucht (Abb. 4.3 A). Die in der Region R1 befindlichen Zellen, die mit 89% den größten Anteil an der isolierten Lymphozytenpopulation stellten, waren 7-AAD-negativ und somit lebend. Hingegen waren die in der Region R2 liegenden Zellen, sie machten einen Anteil von 11% aus, sowohl kleiner als auch 7-AAD-positiv und somit tot.



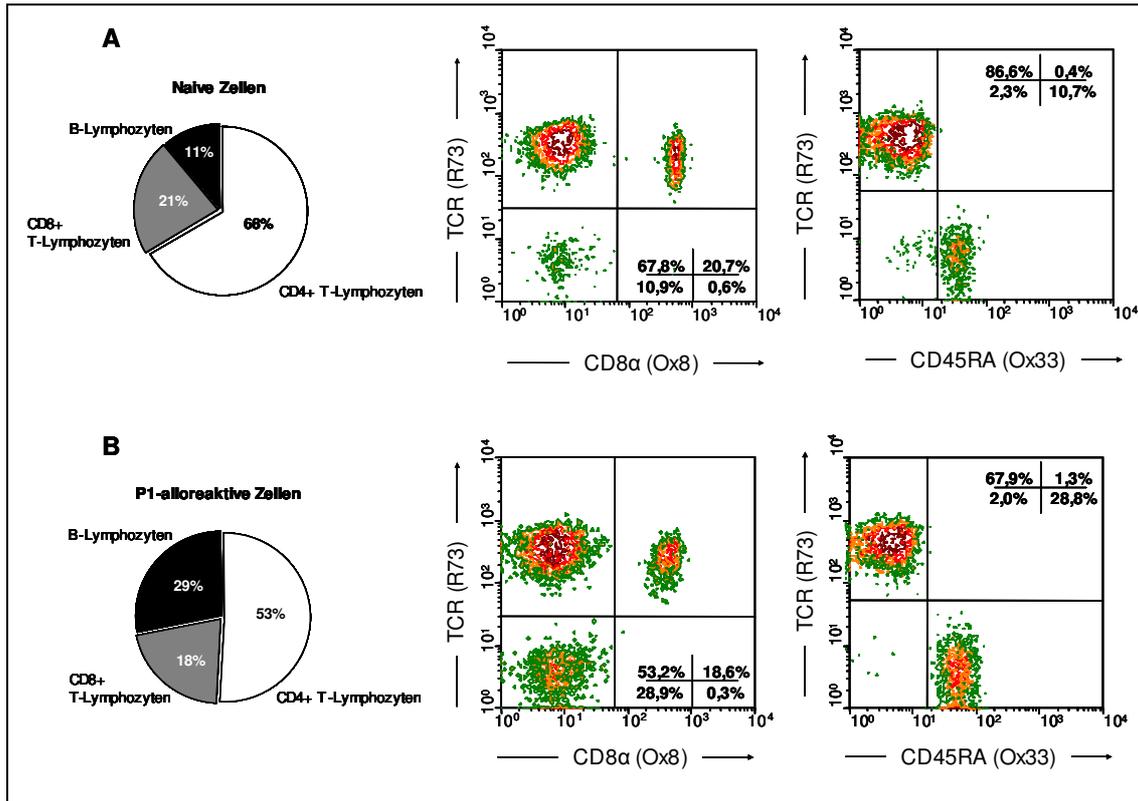
**Abb. 4.3:** Die Immunisierung von Lewis-Ratten mit P1 führte zu aktivierten (CD25-positiven) CD4+ T-Lymphozyten (oberer rechter Quadrant in B), die zudem im Proliferationsassay (Abschnitt 3.5) antigenspezifisch restimulierbar waren (C). Tote Zellen wurden von der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen. Die Größenverteilung (FSC) der isolierten Lymphknotenzellen zeigt, dass die in R1 liegenden, größeren Zellen im Gegensatz zu den in R2 liegenden, kleineren Zellen 7AAD-negativ und somit lebend waren (A). Die in dem Proliferationsassay eingesetzten Lymphknotenzellen wurden entweder mit nicht-beladenen ( $\emptyset$ ) oder P1-beladenen (P1) syngenen DC stimuliert. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

Zunächst wurden die Lymphknotenzellen vor und nach Immunisierung durchflusszytometrisch auf ihre CD25-Expression mit dem anti-CD25 Antikörper Ox39 untersucht (Abb. 4.3 B). Auch vor der Immunisierung waren CD25-positive T-Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten nachweisbar. Hierbei handelt es sich um sogenannte natürlich vorkommende regulatorische CD4+ CD25+ T-Lymphozyten (Kuckein O, 2005). Wie in Abbildung 4.3 B dargestellt,

fürte die Immunisierung mit P1 zu einem starken Anstieg aktivierter (CD25-positiver) CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Wird der Anteil regulatorischer T-Lymphozyten (ca. 4%; Abb. 4.3) herausgerechnet, so führte die Immunisierung mit P1 zu einem Anteil von 3,7% aktivierten T-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass nahezu jeder 27. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyt im poplitealen Lymphknoten (100/3,7) durch die subkutane Injektion von P1 aktiviert wurde (siehe hierzu Abb. 4.3 B). Dies entspricht den Werten publizierter Daten (Benichou G et al., 1999).

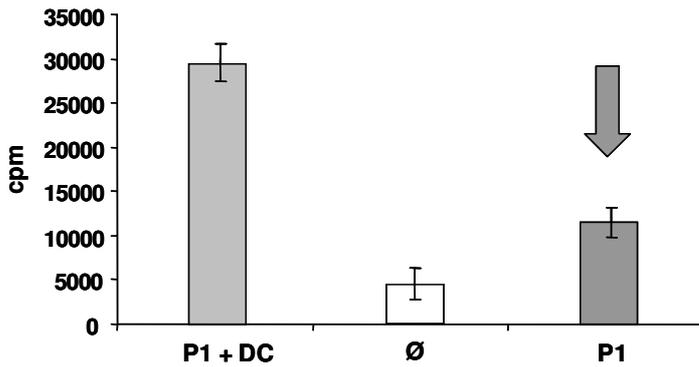
Da durch die Immunisierung mit P1 maximal 3,7% der Lymphknotenzellen antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten waren (siehe oben), bedeutet dies, dass sich unter den  $1 \times 10^5$  Lymphknotenzellen, die für den T-Zellproliferationsassay routinemäßig eingesetzt wurden, ca. 4000 antigenspezifische T-Lymphozyten befanden. Wurden diese Lymphknotenzellen im T-Zellproliferationsassay mit P1-beladenen dendritischen Zellen für 72 Stunden stimuliert, so war eine Proliferation von  $29.346 \pm 2.070$  cpm (n=30) nachweisbar (Abb. 4.3 C). Im Kontrollansatz, d.h. die isolierten Lymphknotenzellen wurden nicht mit P1 inkubiert, wurde hingegen eine Proliferation von  $4.453 \pm 1.798$  cpm gemessen (was einen Anstieg um das 6,6-fache entspricht).

Als nächstes wurde die Verteilung der verschiedenen Populationen, B-Lymphozyten sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, in den Lymphknotenzellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei fiel auf, dass sich der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Immunisierung von 68% auf 53% leicht verringerte (Abb. 4.4). Hingegen blieb der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nahezu unverändert (vor Immunisierung: 21%; nach Immunisierung: 18%). Auffällig war auch, dass sich der Anteil der B-Lymphozyten nach der Immunisierung deutlich erhöhte (vor Immunisierung: 11%; nach Immunisierung: 29%). Dies lässt darauf schließen, dass durch Immunisierung auch B-Lymphozyten aktiviert wurden.



**Abb. 4.4:** Verteilung der Lymphozytenpopulationen im poplitealen Lymphknoten vor (A) und nach (B) Immunisierung mit dem Peptidantigen P1. Vor Immunisierung dominierten die CD4+ T-Lymphozyten (A), während nach Immunisierung ihr Anteil leicht abnahm (B). Doch zeigen die Analysen in Abb. 4.3, dass CD25-positive CD4+ T-Lymphozyten durch Immunisierung mit P1 nachzuweisen sind. Auch der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten hat sich mehr als verdoppelt. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen. TCR = T-cell receptor (T-Zellrezeptor).

Die hier präsentierten Daten zeigen somit, dass die subkutane Applikation des Peptidantigens P1 zu einer Immunaktivierung in den poplitealen Lymphknoten führte; ein erster Hinweis hierauf waren die vergrößerten Lymphknoten. In den hieraus isolierten Lymphknotenzellen waren aktivierte und somit CD25-positive CD4+ T-Lymphozyten nachzuweisen (3,7%; Abb. 4.3). Im T-Zellproliferationsassay schließlich wurde gezeigt, dass die nach der Immunisierung mit P1 vorhandenen CD4+ T-Lymphozyten durch P1-beladene autologe dendritische Zellen aktiviert wurden (Abb 4.5). Während nicht beladene dendritische Zellen keine Wirkung zeigten. Dies deutet darauf hin, dass durch die Immunisierung mit P1 antigenspezifische CD4+ T-Lymphozyten entstehen.



**Abb. 4.5:** Restimulation P1-spezifischer T-Lymphozyten durch das Peptidantigen P1 in An- bzw. Abwesenheit dendritischer Zellen. Hierzu wurden die nach Immunisierung mit P1 aktivierten Lymphknotenzellen isoliert und im Proliferationsassay eingesetzt (Abschnitt 3.5). Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

**Legende:**

- P1+DC : Restimulation P1-spezifischer Lymphknotenzellen mit P1-beladenen dendritischen Zellen (DC).
- Ø : Inkubation P1-spezifischer Lymphknotenzellen ohne Antigen und dendritischen Zellen.
- P1 : Restimulation P1-spezifischer Lymphknotenzellen nur mit P1 (= Auto-stimulation).

Wird zu den isolierten Lymphknotenzellen, die antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten enthalten (Abb. 4.3 B), ausschließlich das Peptid P1 gegeben, so ist ebenfalls eine deutliche, über dem Kontrollwert liegende Proliferation von  $11.513 \pm 1.671$  cpm ( $n=30$ ) zu messen. Die Kontrolle, also T-Lymphozyten, die ohne P1 kultiviert wurden, lag bei  $4.453 \pm 1.798$  cpm (Abb. 4.5).

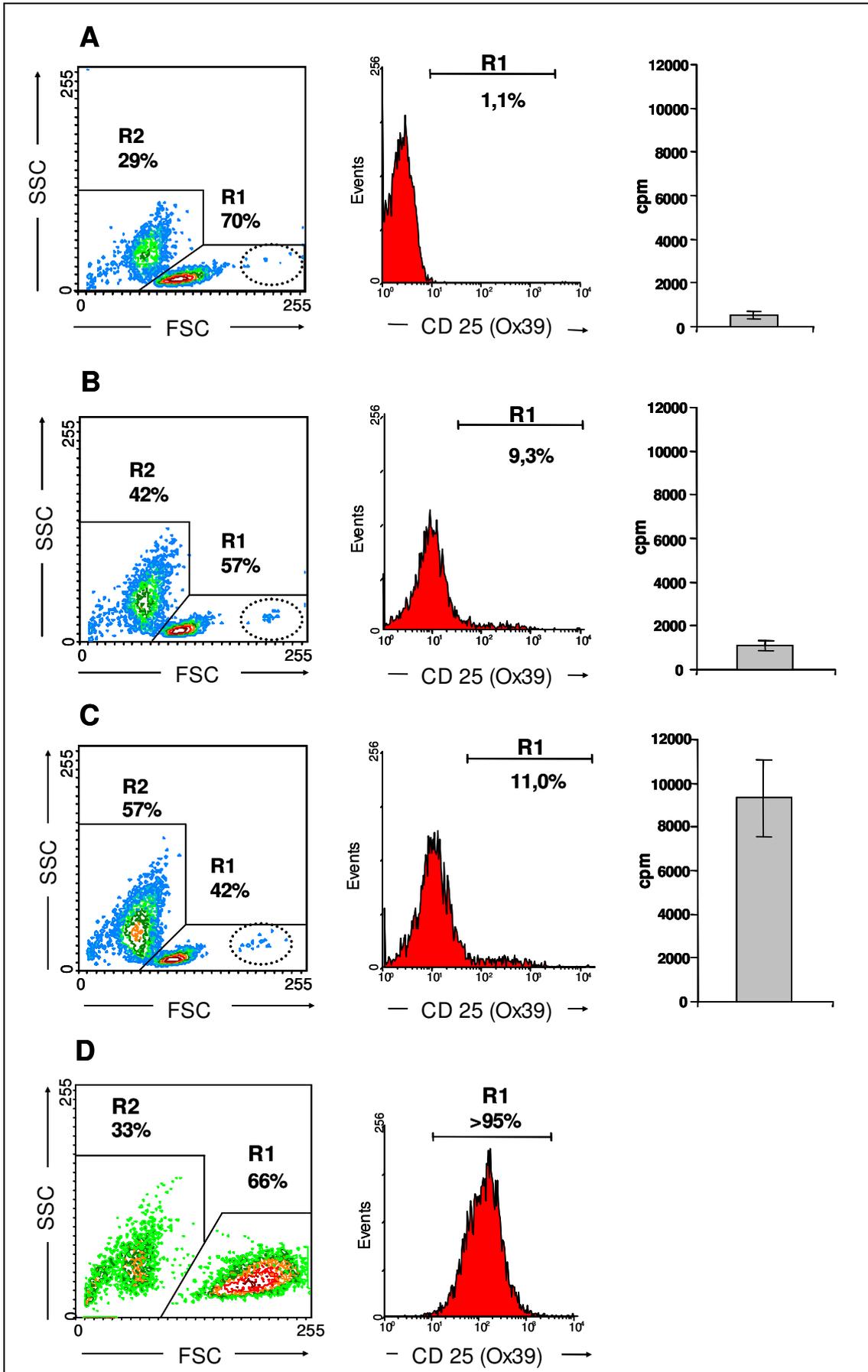
Zwar steigerte die Anwesenheit P1-beladener antigenpräsentierender Zellen die Proliferation auf  $29.346 \pm 2.070$  cpm, doch wurde in mehr als 15 unabhängigen Experimenten gezeigt, dass P1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten auch durch die alleinige Zugabe von P1 restimuliert wurden (Abb. 4.5). Naive T-Lymphozyten ließen sich hingegen mit diesem Verfahren nicht aktivieren (Daten nicht gezeigt). Um dieses Phänomen der Autostimulation im Detail zu untersuchen, wurden die T-Lymphozyten mit dem Antikörper R73, der gegen den  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor gerichtet ist, aus den poplitealen Lymphknotenzellen aufgereinigt. Um sicher zu stellen, dass diese Aufreinigung nicht die Vitalität der R73-positiven T-Lymphozyten beeinflusste, wurden sie zuvor durchflusszytometrisch und im T-Zellproliferationsassay untersucht (Abb. 4.6).

Wie in Abbildung 4.6 zu erkennen ist, sind im FSC-SSC-Diagramm zwei Populationen zu unterscheiden: die in R1 liegenden R73-positiven T-Lymphozyten und die in R2 liegenden toten Zellen (s. auch Abb. 4.3). Zusätzlich sind in R1 Zellen zu erkennen, die sich durch ihre Größe deutlich von der Hauptpopulation abgrenzen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um T-Zellblasten. Zwar nehmen die in R1 liegenden R73-positiven Zellen von 70% nach 24 Stunden (Abb. 4.6 A) auf 42% nach 72 Stunden (Abb. 4.6 C) ab, doch war ein deutlicher Anstieg der T-Zellblasten zu erkennen (durch einen Kreis markiert). Diese Zunahme im FSC/SSC-Diagramm korreliert sowohl mit der Zunahme an CD25-positiven T-Lymphozyten im Histogramm (von 1,1% nach 24-stündiger Inkubation auf 11% nach 72-stündiger Kultivierungsdauer) als auch mit einer ansteigenden T-Zellproliferation durch Autostimulation. Die Daten hierzu:  $987 \pm 135$  ( $n=3$ ) nach 24 Stunden,  $1352 \pm 1200$  ( $n=3$ ) nach 48 Stunden und  $9.337 \pm 1.764$  cpm ( $n=3$ ) nach 72 Stunden. Die Aufreinigung der poplitealen Lymphozyten nach Immunisierung mit P1 in R73-positiven T-Lymphozyten beeinflusst somit nicht ihre Vitalität (= Restimulierbarkeit) im Proliferationsassay.

Die polyklonale Stimulierung mit PMA und Ionomycin (Abschnitt 3.8) für 24 Stunden zeigte eine deutliche Zunahme der aktivierten T-Lymphozyten auf über 60% in R1 sowie eine massive Aktivierung. Über 95% aller R73-positiven T-Lymphozyten waren CD25 positiv (4.6 D). Die Kontrolle zeigt ebenfalls, dass eine rasche Aktivierung die T-Lymphozyten vor dem Zelltod bewahrt (zumindest innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden).

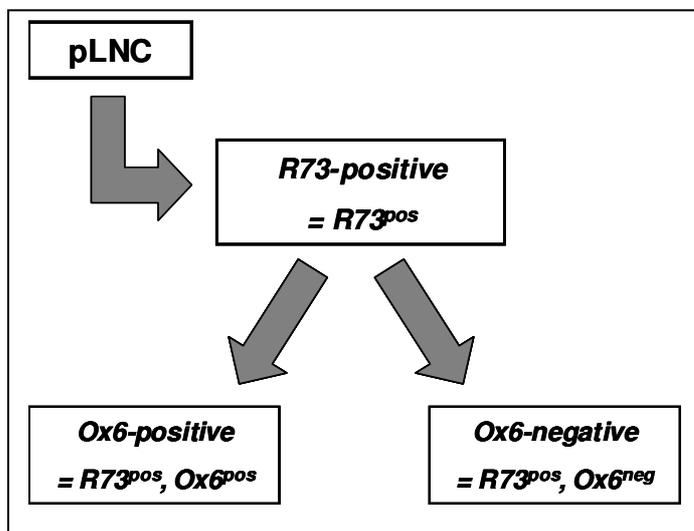
Nächste Seite (Seite 24):

**Abb. 4.6:** Messung der Autostimulation aufgereinigter R73-positiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Proliferationsassay. Die Zellen wurden mit dem allogenen Peptid P1 für 24 (A), 48 (B) und 72 (C) Stunden *in vitro* kultiviert. Dabei nahm der Anteil CD25-positiver Zellen in R1 kontinuierlich zu (Histogramme in A-C). Trotz dieser deutlichen Autostimulation P1-spezifischer T-Lymphozyten nahm der Anteil der in R1-befindlichen Zellen kontinuierlich ab und gleichzeitig in R2 (= 7AAD-positiven Zellen; s. auch Abb. 4.3 A) zu. Die polyklonale Stimulation der R73-positiven T-Lymphozyten mit PMA und Ionomycin war, wie erwartet, sehr erfolgreich (D). Nahezu sämtliche in R1 liegenden T-Lymphozyten waren aktiviert ("Rechtsverschiebung" beim FCS-Parameter) und somit CD25-positiv. Der Kreis in den FSC-SSC-Diagrammen A-C markiert die P1-spezifischen Zellen, die sich ebenfalls durch eine Größenzunahme und CD25-Expression auszeichneten. Repräsentative Darstellung aus drei unabhängigen Stimulationsansätzen.



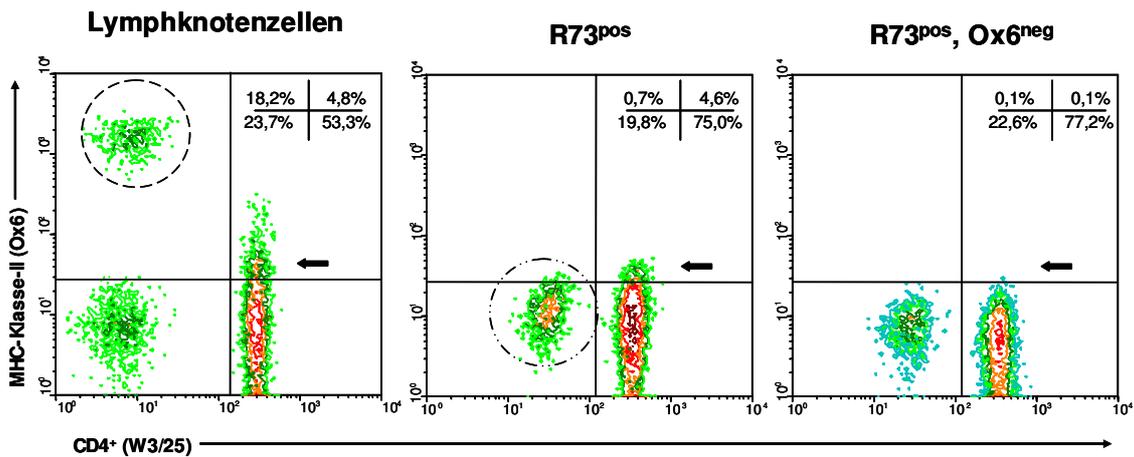
## 4.2 Charakterisierung der $R73^{pos}$ , $Ox6^{neg}$ T-Lymphozyten

Für die Autostimulierung (Abb. 4.5) antigenspezifischer,  $R73$ -positiver T-Lymphozyten sind MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen zur Präsentation von P1 notwendig (Kottenmeier S, 2005). Um die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen zu überprüfen, wurden die MHC-Klasse-II-positiven Zellen mit dem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Ox6 von den MHC-Klasse-II-negativen Zellen abgetrennt (Abb. 4.7).  $R73$ -positive T-Lymphozyten mit einer MHC-Klasse-II-Expression werden als  $Ox6^{pos}$  und MHC-Klasse-II-negative Zellen als  $Ox6^{neg}$  bezeichnet.



**Abb. 4.7:** Darstellung der Aufreinigungsstrategie für die antigenspezifischen  $Ox6^{pos}$  bzw.  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten. Als erstes wurden aus den poplitealen Lymphknoten zellen (pLNC) P1-immunisierter Lewis-Ratten die  $R73^{pos}$  T-Lymphozyten isoliert. Anschließend wurden die  $Ox6^{pos}$  Zellen mit dem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Ox6 positiv selektiert (Abschnitt 3.5). Die verbliebenen  $R73^{pos}$  Zellen stellten die  $Ox6^{neg}$  Population dar.

Die nach Aufreinigung der  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten verbliebenen  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten wurden als erstes genauer untersucht. Die Charakterisierung dieser Zellen bot sich an, da sie innerhalb der T-Lymphozyten eine relativ große Population darstellten:  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$ :  $1,8 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$  Zellen im Vergleich zu  $2,1 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$   $R73^{pos}$  T-Lymphozyten ( $n=10$ ). Nach Untersuchungen von Stefan Kottenmeier sollten die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten keine MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit nicht zur Autostimulation fähig sein (Kottenmeier S, 2005). In dieser Arbeit wurden mit aufgereinigten  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten die Experimente durchgeführt.



**Abb. 4.8:** Identifizierung MHC-Klasse-II-positiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Immunisierung mit P1 innerhalb der Lymphknotenzellen (linkes Diagramm), der R73<sup>pos</sup> T-Lymphozyten (mittleres Diagramm) und der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> Zellen (rechtes Diagramm). Dabei sind MHC-Klasse-II-positiv CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nur in den beiden ersten Populationen eindeutig nachzuweisen (Pfeil). Repräsentative Darstellung aus 3 unabhängigen, für diese Analysen vorgesehenen Aufreinigungen.

**Legende:**

-  MHC-Klasse-II-positive B-Lymphozyten
-  CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten
-  MHC-Klasse-II-positiv CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

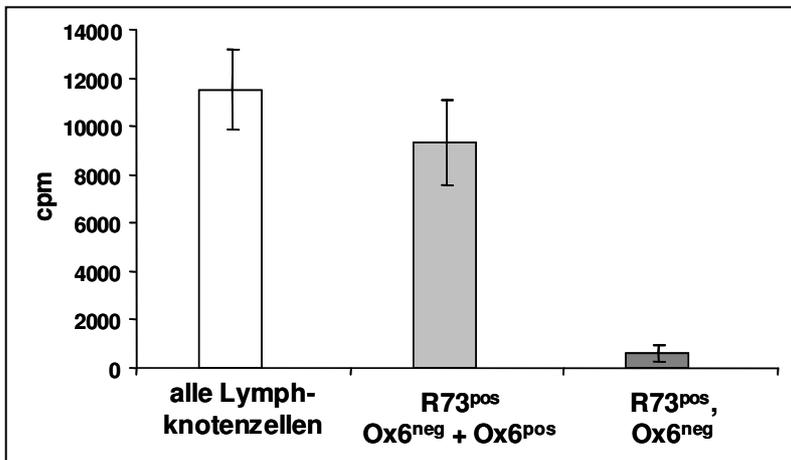
Die durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten R73<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zeigte, dass sich nach ihrer Positivselektion mit dem Antikörper R73 auch weiterhin MHC-Klasse-II-positiv Zellen unter ihnen befanden (Abb. 4.8 Mitte). Sie ließen sich mit dem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Ox6 depletieren. Dabei verringerte sich ihr prozentualer Anteil von 4,6% auf 0,1% (Abb. 4.8 Rechts).

Als nächstes wurde die Fähigkeit der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten zur Auto-stimulation getestet. Wie erwartet, wurde nach Zugabe des Peptidantigens P1 keine Proliferation beobachtet (Abb. 4.9). Der Vergleich der Proliferation von R73<sup>pos</sup> Zellen, hierbei handelte es sich ja um ein Gemisch aus Ox6<sup>pos</sup> und Ox6<sup>neg</sup> Zellen, sowie von Lymphknotenzellen nach Zugabe von P1 verdeutlicht dies: R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten: 585 ± 335 cpm (n=10), R73<sup>pos</sup> T-

## 4 Ergebnisse

---

Lymphozyten:  $9.337 \pm 1.764$  cpm (n=10) und Lymphknotenzellen:  $11.513 \pm 1.671$  cpm (n=18). Dieses Ergebnis bestätigt somit die Vermutung, dass die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten nicht zur Autostimulation befähigt sind.

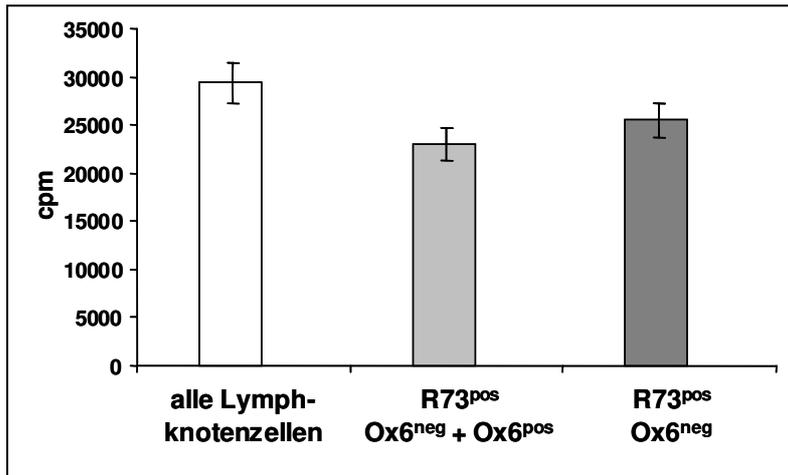


**Abb. 4.9:** Die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten sind nach alleiniger Zugabe von P1 nicht zur Autostimulation fähig. Dagegen zeigten die poplitealen Lymphknotenzellen und die hieraus aufgereinigten  $R73^{pos}$  Zellen, ein Gemisch aus  $Ox6^{pos}$  und  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten, eine deutliche Proliferation.

### Legende:

- alle Lymphknotenzellen : Lymphknotenzellen, die 7 Tage nach Immunisierung mit P1 aus den poplitealen Lymphknoten isoliert wurden.
- $R73^{pos}$   $Ox6^{neg}$  +  $Ox6^{pos}$  : die aus den poplitealen Lymphknotenzellen mit dem Antikörper R73 aufgereinigten T-Lymphozyten.
- $R73^{pos}$   $Ox6^{neg}$  : MHC-Klasse-II negative T-Lymphozyten nach der Positivselektion mit Ox6 (Abb. 4.7).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten aus dem Grund mit P1 nicht restimulierbar waren, weil sich in dieser Population keine P1-spezifischen T-Lymphozyten befanden, wurde ihre Präsenz im Proliferationsassay in Anwesenheit P1-beladener dendritischer Zellen überprüft (Abb. 4.10). Hier wurde eindeutig gezeigt, dass die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten restimulierbar waren. Die in Abb. 4.9 dargestellte Unfähigkeit dieser Zellen zur Autostimulation beruhte somit nicht auf der Abwesenheit P1-spezifischer T-Lymphozyten, sondern auf ihrer Unfähigkeit, das Peptid P1 zu binden und zu präsentieren. Hierzu sind MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche notwendig, die den  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten fehlen. Diese Vermutung wird ebenfalls mit Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie (Abb. 4.8) und RT-PCR (Abb. 4.14) bestätigt. Die Werte für die Autostimulation im Einzelnen (Abb. 4.9):  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$ :  $25.451 \pm 1.702$  cpm (n=4), Lymphknotenzellen (pLNC):  $29.346 \pm 2.070$  cpm (n=4) und  $R73^{pos}$  T-Lymphozyten:  $22.981 \pm 1.745$  cpm (n=4).

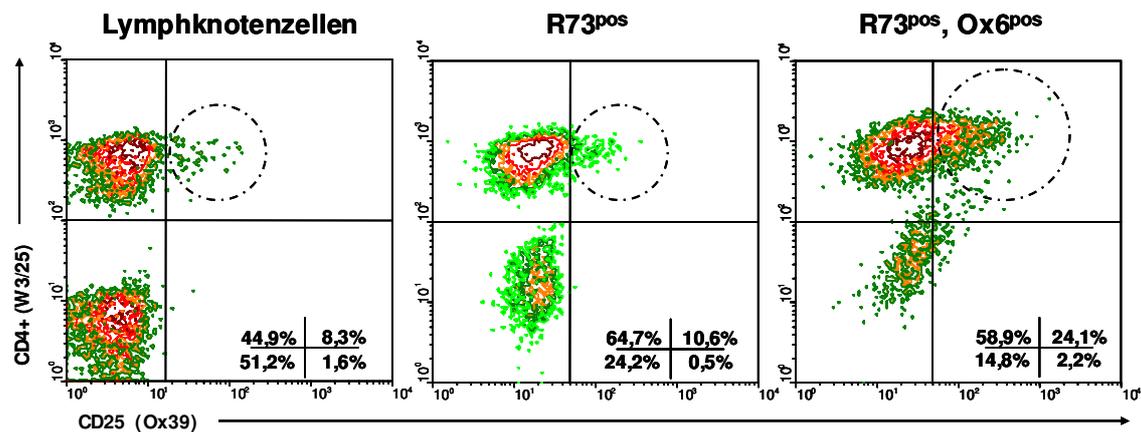


**Abb. 4.10:** T-Zellproliferation mit P1-beladenen dendritischen Zellen zum Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten. Die Restimulation der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten führte zu einer Proliferation in der Größenordnung der Restimulation von Lymphknotenzellen und R73<sup>pos</sup> T-Lymphozyten.

Weitere Informationen zur Achsenbeschriftung siehe Abb. 4.9.

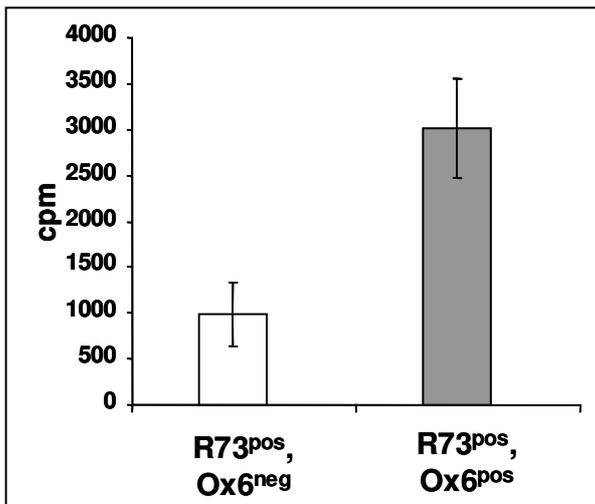
### 4.3 Charakterisierung der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten

In den folgenden Experimenten wurden nun die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten eingehender untersucht, die mit dem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Ox6 aus der R73<sup>pos</sup> Population isoliert wurden (Abb. 4.7). Mit ca. 24% war ein geringer Anteil der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten CD25-positiv, während der Großteil, nämlich ca. 59%, CD25-negativ war (Abb. 4.11).



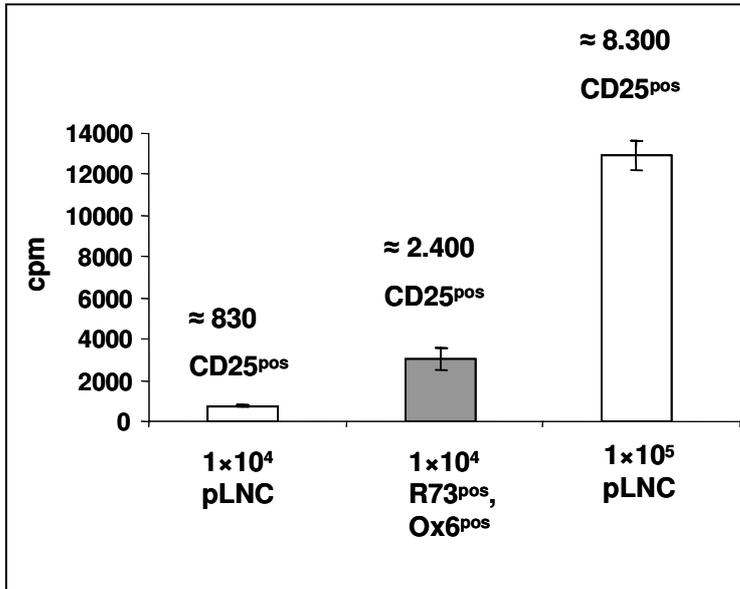
**Abb. 4.11:** Durchflusszytometrische Analyse der CD25-Expression auf Lymphknotenzellen (nach Immunisierung mit P1), aufgereinigten R73<sup>pos</sup> und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten. Mit 24,1% war zwar ein deutlicher Anteil der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten CD25-positiv, die Mehrzahl mit nahezu 59% war jedoch negativ. Die doppelt positiven Zellen sind mit einem Kreis markiert. Die CD4-negativen Zellen (14,8%) werden als Verunreinigung interpretiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich hierbei um CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die nicht depletiert wurden. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

Da die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-positiv waren, wurde untersucht, ob sie sich nach Zugabe von P1 restimulieren ließen; also das Phänomen der Autostimulation zeigen. Wie Abbildung 4.12 zeigt, war dies in der Tat möglich: R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten proliferierten deutlich stärker ( $3.014 \pm 539$  cpm; n=3) als die MHC-Klasse-II-negativen R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten ( $978 \pm 347$  cpm).



**Abb. 4.12:** R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zeigen das Phänomen der Autostimulation. Sowohl R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> als auch R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten erhielten hierzu das P1 ohne dendritische Zellen. Im Gegensatz zu den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> waren die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten hierzu nicht in der Lage. Dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten (Abb. 4.8) auch antigenspezifische T-Lymphozyten enthielten, ist in Abb. 4.10 dargestellt. In Gegenwart P1-beladener syngener dendritischer Zellen sind sie nämlich restimulierbar (Abb. 4.10).

Aufgrund der geringen Anzahl aufgereinigter R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten ( $1,1 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$  aus  $8,6 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$  Lymphknotenzellen; n=8) wurden statt der üblichen  $1 \times 10^5$  lediglich  $1 \times 10^4$  Responderzellen pro Vertiefung einer 96-"well" Rundbodenplatte für den T-Zellproliferationsassay eingesetzt, um so eine ausreichende Anzahl an Parallelwerten zu erhalten (Abb. 4.12). Eine Verringerung der für diesen Assay optimierten Anzahl an Responderzellen von  $1 \times 10^5$  (Kottenmeier S, 2005) geht selbstverständlich mit einer deutlichen Schwächung der Proliferation einher, wie folgende Zahlen verdeutlichen:  $1 \times 10^5$  pLNC als Responderzellen:  $12.932 \pm 677$  cpm (n=2) und  $1 \times 10^4$  pLNC:  $746 \pm 49$  cpm (n=2). Auch wenn mit  $1 \times 10^4$  R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten 10-mal weniger Zellen als üblich im Proliferationsassay eingesetzt wurden, so lassen doch die Messdaten in Abb. 4.12 die Aussage zu, dass R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zur Autostimulation fähig sind.



**Abb. 4.13:** Vergleich der Autostimulation von poplitealen Lymphknotenzellen (pLNC) bei unterschiedlichen Zellzahlen ( $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$ ) und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten. Die Proliferation von  $1 \times 10^4$  R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> Zellen war zwar deutlich geringer als für  $1 \times 10^5$  pLNC, aber deutlich stärker als für  $1 \times 10^4$  pLNC.

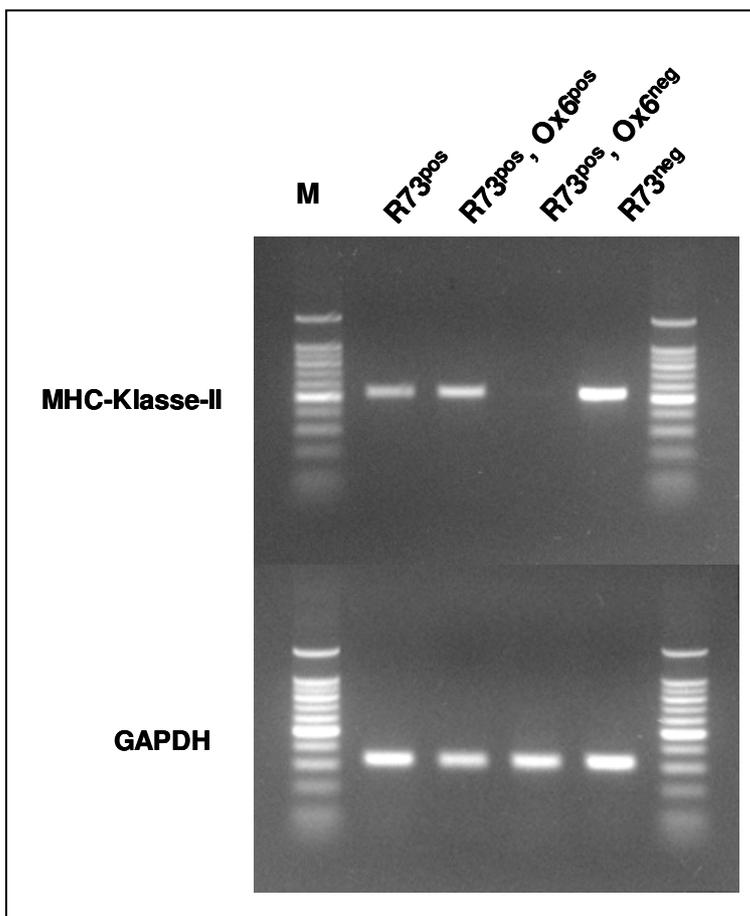
Um abzuschätzen, ob die in Abb. 4.13 (zum Teil identisch mit Abb. 4.12) dargestellte Stärke der Autostimulation von R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten bezüglich der Anzahl antigenspezifischer T-Lymphozyten realistisch erscheint, wird folgende Kalkulation aufgestellt (Tab. 4.1):

**Tab. 4.1:** Vergleich der zur Messung der Autostimulation (Abb. 4.13) eingesetzten Zellzahl sowie der kalkulierte Anteil aktivierter T-Lymphozyten.

Im Assay eingesetzte Zellen	Zellzahl	kalkulierter Anteil aktivierter T-Lymphozyten	Proliferation
pLNC	$1 \times 10^4$	830 nach Abb. 4.11 (8,3%)	$746 \pm 49$ cpm
pLNC	$1 \times 10^5$	8.300 nach Abb. 4.11(8,3%)	$12.932 \pm 677$ cpm
R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup>	$1 \times 10^4$	2.400 nach Abb. 4.11 (24%)	$3.014 \pm 539$ cpm

Da die Stärke der Autostimulation vom Anteil antigenspezifischer T-Lymphozyten abhängt, lässt sich die Proliferation pro antigenspezifischer Zelle berechnen, indem der Quotient aus gemessener Proliferation (12.932 cpm; Tab. 4.1) und dem kalkulierten Anteil antigenspezifischer T-Lymphozyten (8.300; Tab. 4.1) gebildet wird; dieser beträgt 1,6 cpm/Zelle. Wird für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten ein Anteil an 2.400 aktivieren Zellen angenommen und dieser Wert mit 1,6 multipliziert, so beträgt die berechnete Proliferation 3.840 cpm. Dieser Wert liegt nur 27% über dem experimentell ermittelten Wert, so dass die gemessene Proliferation für  $1 \times 10^4$  R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten auch aufgrund dieser Kalkulation realistisch erscheint.

Die durchflusszytometrischen Analysen von R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zeigen, dass sie MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abb. 4.8). Als nächstes wurde überprüft, ob sie die genetische Information für MHC-Klasse-II Moleküle auch aktiv "abrufen", d.h. ob spezifische mRNA nachzuweisen ist. Hierzu wurde aus diesen Zellen Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert, um mit spezifischen Primern (Tab. 3.2) ein Produkt mit der Polymerasekettenreaktion oder PCR zu amplifizieren (Abb. 4.14).

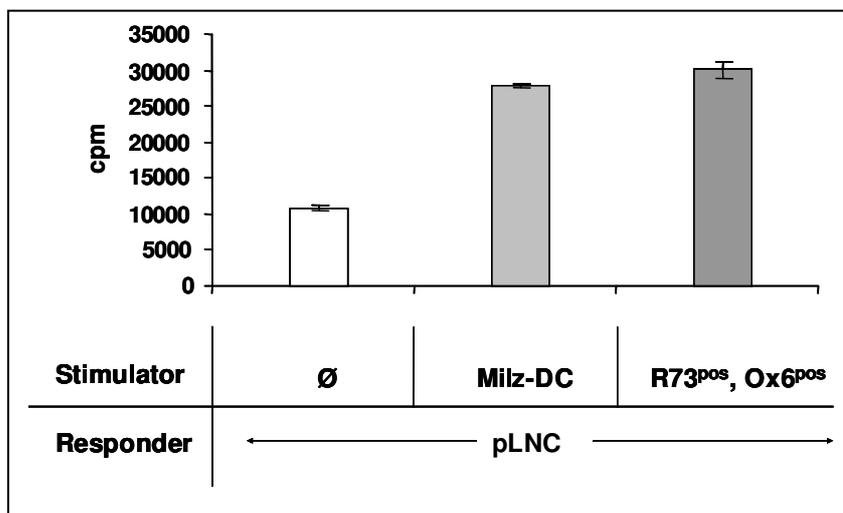


**Abb. 4.14:** R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten sind positiv für MHC-Klasse-II-mRNA in der RT-PCR. Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> Zellen waren hingegen negativ. Aufgrund der Vordaten (Abb. 4.8 und 4.9) wurde dies erwartet. Zum Vergleich war sowohl die Population der R73<sup>pos</sup> CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten als auch die der R73<sup>neg</sup> Zellen (B-Lymphozyten, siehe Abb. 4.8) MHC-Klasse-II-mRNA positiv. Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen RT-PCR zweier Zellisolierungen. Aus der RNA dieser beiden Isolierungen sind jeweils zwei unabhängige cDNA-Synthesen mit anschließender PCR durchgeführt worden. M= 100 Basenpaar-Leiter.

Somit wurde exklusiv für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten spezifische mRNA für MHC-Klasse-II-Moleküle nachgewiesen, während die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten hierfür negativ waren.

#### 4.4 $R73^{pos}$ , $Ox6^{pos}$ T-Lymphozyten als Stimulatorzellen

Da  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten zur Autostimulation fähig sind (Abb. 4.12), wurde nun überprüft, ob sie auch, wie dendritische Zellen, als Stimulatorzellen im T-Zellproliferationsassay ( $1 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung) eingesetzt werden können. Hierzu wurden die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten, wie auch die dendritischen Zellen, mit 20 Gy bestrahlt. Anschließend wurden sie mit dem synthetischen Peptid P1 von außen beladen und mit  $1 \times 10^5$  antigenspezifischen T-Lymphozyten inkubiert. Die Abbildung 4.15 zeigt, dass  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten als Stimulatorzellen zu einer vergleichbaren Proliferation führten wie die Verwendung von dendritischen Zellen:  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten:  $30.054 \pm 1.195$  cpm ( $n=2$ ) und dendritische Zellen:  $27.771 \pm 268$  cpm ( $n=5$ ). Die Proliferation unaufgereinigter Lymphknotenzellen (pLNC) nach Zugabe von P1 betrug  $10.754 \pm 397$  cpm.



**Abb. 4.15:**  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten als Stimulatorzellen im Proliferationsassay. Sie können, wie mit P1 beladene dendritische Zellen, Lymphknotenzellen (isoliert aus P1 immunisierten Lewis-Ratten) stimulieren.

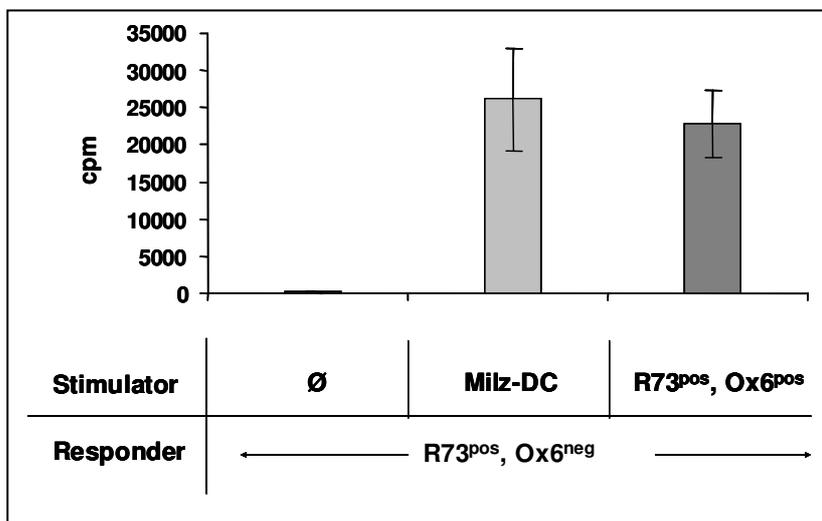
#### Legende:

- pLNC : 7 Tage nach Immunisierung mit P1 aus den poplitealen Lymphknoten isolierte popliteale Lymphknotenzellen.
- Ø : keine Stimulatorzellen.
- Milz-DC : reife dendritische Zellen (DC) aus Milzen von Lewis-Ratten.
- $R73^{pos}$   $Ox6^{pos}$  : MHC-Klasse-II positive T-Lymphozyten (Abb. 4.11).

## 4 Ergebnisse

---

In einer weiteren Versuchsserie wurde gezeigt, dass mit P1 beladene  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten ebenfalls  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{neg}}$  Responderzellen (Abb. 4.16). stimulierten. Dabei war die Stärke, der von ihnen induzierten Proliferation mit  $22.803 \pm 4.564$  cpm ( $n=2$ ) vergleichbar mit der P1-beladener dendritischer Zellen ( $26.111 \pm 6.945$  cpm). Wie bereits gezeigt (Abb. 4.9) lassen sich die  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten durch alleinige Zugabe von P1 nicht restimulieren ( $207 \pm 120$  cpm).



**Abb. 4.16:**  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten eignen sich als Stimulatorzellen im T-Zellproliferationsassay. Sie stimulierten, wie P1-beladene dendritische Zellen (Milz-DC), antigenspezifische  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{neg}}$  T-Lymphozyten. Ø: ohne Stimulatorzellen. Informationen zu den Abkürzungen siehe Abb. 4.15.

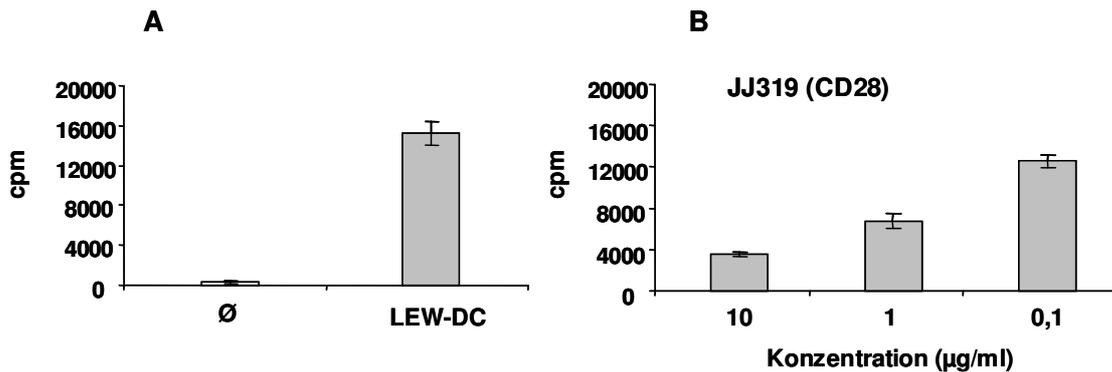
Die in diesem Kapitel präsentierten Daten zeigen, dass  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten, die durch Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 induziert wurden, die Restimulation P1-spezifischer T-Lymphozyten als Stimulatorzellen auslösen. Um eine Autostimulation innerhalb der  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten zu vermeiden, wurden sie bestrahlt. Für die  $R73^{\text{pos}}$ ,  $Ox6^{\text{pos}}$  T-Lymphozyten wurde sowohl die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche (Abb. 4.11), als auch spezifische mRNA in der RT-PCR (Abb. 4.14) nachgewiesen.

#### **4.5 Nachweis der Kostimulation bei $R73^{pos}$ , $Ox6^{pos}$ T-Lymphozyten**

Von reifen dendritischen Zellen, die als antigenpräsentierende Stimulatorzellen routinemäßig im Proliferationsassay eingesetzt werden, ist bekannt, dass sie die Fähigkeit zur Kostimulation besitzen. Die Daten aus Kapitel 4.4 lassen diese Fähigkeit auch für die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten vermuten. Zur Untersuchung dieser Annahme wurden die Zellen in einer so genannten gemischten Leukozytenkultur oder "*mixed leukocyte culture*" mit "naiven" allogenen Lymphknotenzellen aus Wistar-Furth-Ratten inkubiert. Dieser Assay erlaubt auf einfache Art und Weise "naive" T-Lymphozyten antigenspezifisch zu aktivieren.

In der gemischten Leukozytenkultur können T-Lymphozyten nur dann aktiviert werden, wenn die entsprechenden Stimulatorzellen neben allogenen MHC-Molekülen als Antigen auch kostimulatorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Hierzu wurden aus der Lewis-Ratte isolierte dendritische Zellen mit naiven T-Lymphozyten aus Lymphknoten von Wistar Furth Ratten inkubiert. Die hierzu durchgeführten Experimente belegen eine T-Zell-Proliferation von  $15.209 \pm 1.254$  cpm (Abb. 4.17 A; n=2), während die Proliferation der WF-Lymphknotenzellen ohne allogene Stimulatorzellen ausblieb ( $359 \pm 142$  cpm).

Die Aktivierung "naiver" T-Lymphozyten blieb jedoch aus, wenn der CD28-Rezeptor mit dem anti-CD28-Antikörper JJ319 blockiert wurde; diese Hemmung war zudem konzentrationsabhängig (Abb. 4.17 B):  $10 \mu\text{g/ml}$ :  $3.542 \pm 263$  cpm;  $1 \mu\text{g/ml}$ :  $6.756 \pm 707$  cpm;  $0,1 \mu\text{g/ml}$ :  $12.559 \pm 595$  cpm (n=2). Diese durch JJ 319 vermittelte Hemmung unterstreicht die Bedeutung kostimulatorischer Moleküle in der gemischten Leukozytenkultur.

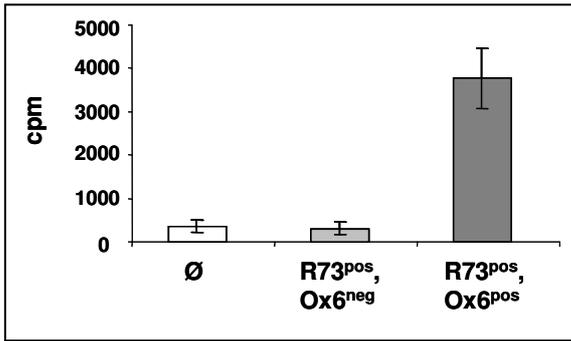


**Abb. 4.17:** Vorexperimente in der gemischten Leukozytenkultur (*“mixed leukocyte culture“*) zum Nachweis, dass naive T-Lymphozyten zur ihrer Aktivierung kostimulatorische Signale (hier die über die Interaktion von CD80/CD86 und CD28 vermittelten Signale) benötigen. Lymphknotenzellen, die aus einer naiven WF-Ratte isoliert wurden, proliferierten in Gegenwart allogener dendritischer Zellen aus der Lewis-Ratte (A). Mit dem anti-CD28-Antikörper JJ319 ließ sich diese Aktivierung konzentrationsabhängig (von 0,1 bis 10 µg/ml) hemmen (B). Ø: WF-Lymphknotenzellen ohne Stimulatorzellen. Die Proliferation ist als Mittelwert mit Standardabweichung von jeweils 8 Parallelwerten eines Versuchs angegeben.

Anschließend wurde die gemischte Leukozytenkultur anstatt mit allogenen dendritische Zellen mit R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> bzw. R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten durchgeführt (Abb. 4.18).

Aufgrund der bereits vorhandenen Daten (vergl. Abb. 4.8, 4.9 und 4.14) wurde erwartet, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten als Stimulatorzellen für naive T-Lymphozyten ungeeignet sind, da sie keine MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde ein positives Ergebnis für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten erwartet.

Wie Abb. 4.18 zeigt, waren die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wirklich in der Lage, "naive" T-Lymphozyten zu aktivieren. Die Daten im Einzelnen: R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten: 3.767 ± 687 cpm (n=2), R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten: 301 ± 16 cpm (n=2).



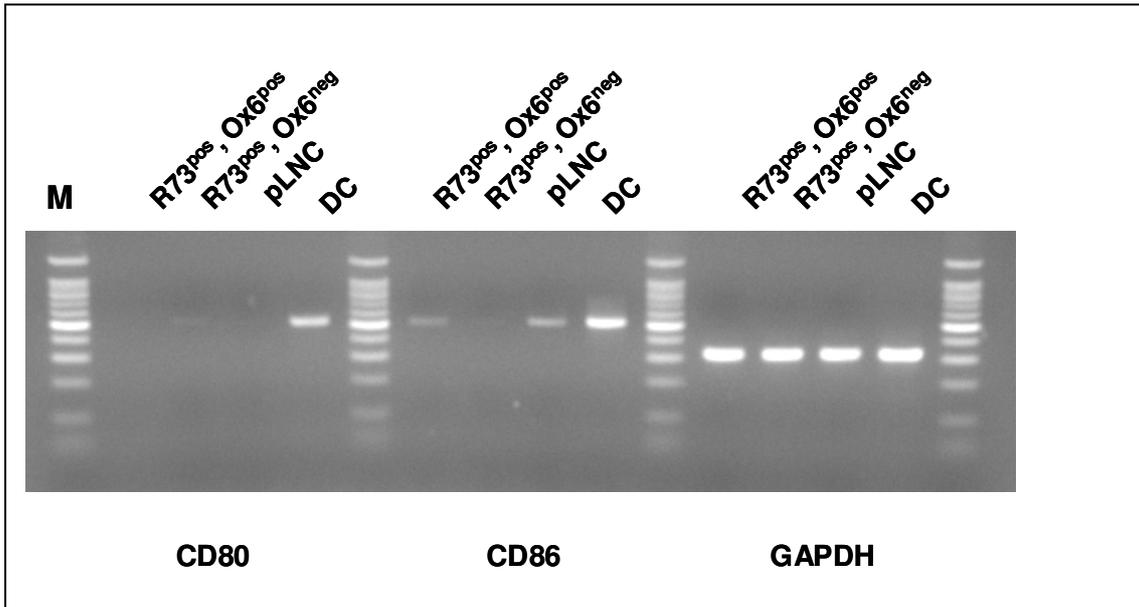
**Abb. 4.18:** Gemischte Leukozytenkultur ("mixed leukocytes culture") mit R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> bzw. R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten als Stimulatorzellen (jeweils  $1 \times 10^4$  Stimulatorzellen für  $1 \times 10^5$  naive T-Lymphozyten). Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> Zellen induzierten eine Proliferation, während die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> Zellen keine Proliferation auslösten.

Ø: keine Stimulatorzellen. Responderzellen: nicht-aufgereinigte popliteale Lymphknotenzellen, wobei die T-Lymphozyten dominieren (Abb. 4.4 A).

Um indirekt zu überprüfen, ob die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten kostimulatorische Moleküle exprimieren, wurden sie auf die Präsenz von CD80 und CD86 mRNA in der RT-PCR untersucht (Abb. 4.19).

Wie Abbildung 4.19 zeigt, wurden für reife dendritische Zellen spezifische mRNA für CD80 und CD86 nachgewiesen. Dies unterstreicht, warum sie ausgezeichnete Stimulatorzellen im T-Zellproliferationsassay sind. Auch die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten waren, wie die Ergebnisse der Proliferationsassays erwarten ließen, positiv für CD86, während CD80 in diesen Zellen nicht nachweisbar war. Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten waren hingegen negativ für CD80 und CD86.

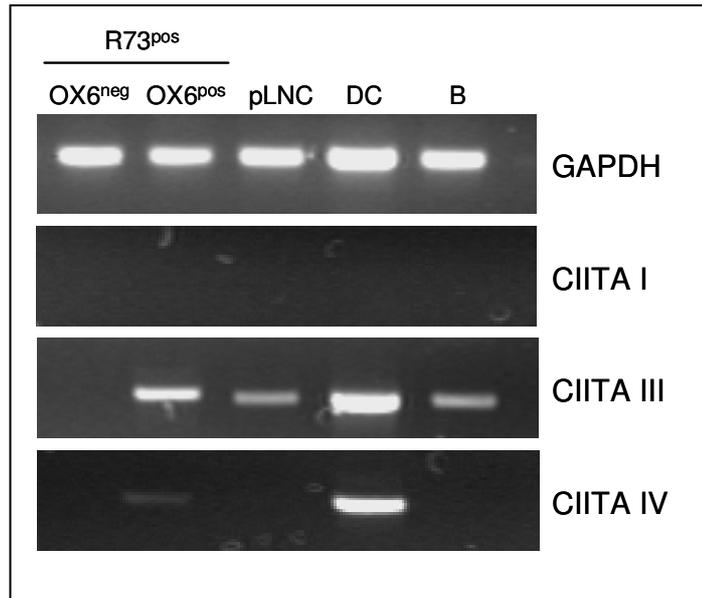
Die Ergebnisse der molekularen Untersuchung (Abb. 4.14 und 4.19) lassen somit den Schluss zu, dass antigenspezifische R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten tatsächlich in der Lage sind, sowohl MHC-Klasse-II als auch CD86 Moleküle zu synthetisieren. Hierin unterscheiden sie sich von den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten.



**Abb. 4.19:** RT-PCR zur Überprüfung der CD80- und CD86-mRNA. Die RT-PCR lieferte für dendritische Zellen (DC) aus der Milz einer naiven Lewis-Ratte positive Signale für CD80- und CD86; wie die Gesamtheit der alloreaktiven Lymphknotenzellen (pLNC). P1-spezifische R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten hingegen waren ausschließlich positiv für CD86, während die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten vollständig negativ für CD80 und CD86 waren. Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen RT-PCR zweier Zellisolierungen. Aus der RNA dieser beiden Isolierungen sind jeweils zwei unabhängige cDNA-Synthesen mit anschließender PCR durchgeführt worden. M= 100 Basenpaar-Leiter.

Die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen wird vom "Master-Regulator" MHC-II Transaktivator/Promotor oder CIITA gesteuert (Steimle V et al., 1995; Wong AW et al., 2005). Dabei ist der Promotor I in dendritischen Zellen, Promotor III in B- und T-Lymphozyten und Promotor IV in Interferon- $\gamma$  induzierten antigenpräsentierenden Zellen zu finden (Muhlethaler-Mottet A et al., 1997). Wie Abb. 4.20 zeigt, wurde tatsächlich nur für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten das Transkript für den Promotor III (CITTA III) erfolgreich nachgewiesen. Ergänzend zu diesen ersten sehr interessanten Daten wäre sicherlich zu überprüfen, ob die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten nach ihrer Restimulation sowohl MHC-Klasse-II Moleküle als auch CIITA exprimieren.

**Abb. 4.20:** RT-PCR Analyse der CIITA Promotor-Expression. Die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen in den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten (Abb. 4.19) korreliert mit der Präsenz des Transaktivators CIITA III, während in den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten kein Transkript nachzuweisen war. Dargestellt ist das Ergebnis einer repräsentativen RT-PCR einer Zellisolierung. Aus der RNA dieser Isolierungen sind jeweils zwei unabhängige cDNA-Synthesen mit anschließender PCR durchgeführt worden. Die dargestellten Banden stammen von einem Gel und sind aus Gründen der Übersicht digital ausgeschnitten und entsprechend neu angeordnet worden. Die entsprechenden Produkte weisen die in Tab. 3.1 aufgeführten Größen auf.



### **Zusammenfassung der Ergebnisse zu den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten (Kapitel 4.2 - 4.5)**

Die Immunisierung von Lewis-Ratten mit dem Peptidantigen P1 induzierte antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Der Anteil CD25-positiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten an den Lymphknotenzellen betrug dabei 3,7% (Abb. 4.3). Sieben Tage nach Immunisierung wurden die aus den poplitealen Lymphknoten isolierten R73-positiven T-Lymphozyten mit Hilfe des anti-MHC-Klasse-II-Antikörpers Ox6 in R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten aufgetrennt. Dabei waren beide Populationen ungleich verteilt: Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten hatten mit 4,6% einen wesentlich geringeren Anteil an der R73<sup>pos</sup> Population als die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten mit 77,2% (Abb. 4.8).

Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten exprimierten MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 4.8). Hierüber ließen sie sich die Zellen mit dem synthetischen Peptid P1 beladen, um sie als Stimulatorzellen einzusetzen. Im Proliferationsassay erwiesen sich die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten als ausge-

zeichnete Stimulatorzellen für P1-spezifische T-Lymphozyten (Abb. 4.15 und 4.16). Auf molekularer Ebene wurde exklusiv für diese Zellen spezifische mRNA für MHC-Klasse-II-Moleküle in der RT-PCR nachgewiesen (Abb. 4.14).

Ebenfalls sehr wichtig für eine effektive Stimulation war, dass R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten auch kostimulatorische Moleküle exprimierten. Indirekt wurde dies in der gemischten Leukozytenreaktion gezeigt (Abb. 4.18), wo sie "naive" T-Lymphozyten aktivierten; hierfür sind kostimulatorische Signale unerlässlich. Diese werden u.a. durch die Oberflächenmoleküle CD80/CD86 auf den Stimulatorzellen und CD28 auf den T-Lymphozyten vermittelt, wie Blockierungsexperimente mit dem anti-CD28 Antikörper belegen (Abb. 4.17 B). Auch gelang der Nachweis spezifischer mRNA für CD86 und CIITA in der RT-PCR (Abb. 4.19 und 4.20). Die Fähigkeit der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten, MHC-Klasse-II und kostimulatorischen Molekülen zu exprimieren, verlieh ihnen immunstimulierende Eigenschaften dendritischer Zellen (Abb. 4.9, 4.15, 4.16).

## 5 Beantwortung der Fragen

### 1. Die subkutane Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 führt zur Aktivierung des Immunsystems von Lewis-Ratten. Welche Auswirkungen sind im Detail zu beobachten?

Die Immunisierung mit dem Peptid P1 führte zu einer starken lokalen Immunaktivierung, die sich in der Vergrößerung der poplitealen Lymphknoten und in einer Zunahme der Lymphknotenzellen um den Faktor 5 zeigte (Abb. 4.2). Die durchflusszytometrische Analyse ergab außerdem einen deutlichen Anstieg an CD25-positiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten von 4,1% auf 7,8% (Abb. 4.3). Hierbei handelte es sich um antigenspezifische Zellen, die sich im T-Zellproliferationsassay durch P1-beladene, syngene dendritische Zellen restimulieren ließen (Abb. 4.6).

### 2. Welche Besonderheit zeigen die P1-spezifischen T-Lymphozyten im T-Zellproliferationsassay?

Lymphknotenzellen, die eine Woche nach der Immunisierung mit P1 isoliert wurden, ließen sich nicht nur durch P1-beladene syngene dendritische Zellen restimulieren, sondern sie zeigten auch die Fähigkeit zur Autostimulierung. Dies bedeutet, dass sich die innerhalb der Lymphknotenzellen befindlichen antigenspezifischen T-Lymphozyten nach Zugabe des Antigens gegenseitig in Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen stimulieren (Abb. 4.9 und Abb. 4.12).

### 3. Nach der Immunisierung mit P1 sind antigenspezifische R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten nachzuweisen.

#### a) Welche Eigenschaften weisen diese Zellen im T-Zellproliferationsassay auf?

Eine Woche nach Immunisierung mit dem Antigen P1 war ca. jeder 27. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyt im poplitealen Lymphknoten aktiviert (Abb. 4.3 und Seite 20). Innerhalb dieser T-Zellpopulation befanden sich MHC-Klasse-II-positive (R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup>) und -negative (R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup>) Zellen. Die aufgereinigten R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten waren ausgezeichnete Stimulatorzellen sowohl bei der Auto-

stimulation (Abb. 4.12) als auch im T-Zellproliferationsassay (Abb. 4.15 und 4.16). Ebenso aktivierten die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten sehr effektiv "naive" T-Lymphozyten in der gemischten Leukozytenkultur (Abb. 4.18).

### **b) Welche molekularbiologischen Charakteristika zeigen sie?**

Der Nachweis, dass R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-positiv waren, wurde molekularbiologisch überprüft. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden wurde in der RT-PCR gezeigt, dass die genetische Information für MHC-Klasse-II-Moleküle aktiv in Form von mRNA ausschließlich in diesen Zellen vorlag. Auch gelang der Nachweis spezifischer mRNA für CD86 und CIITA in der RT-PCR (Abb. 4.19 und 4.20). Zudem waren diese Zellen in der Lage, naive T-Lymphozyten in der gemischten Leukozytenreaktion zu aktivieren.

### **4. Antigen-spezifische R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten sind nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 in den poplitealen Lymphknoten zu finden. Worin unterscheiden sie sich von den ebenfalls nach Immunisierung mit P1 in den Lymphknoten entstehenden R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten?**

Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten, die innerhalb der R73-positiven T-Lymphozyten dominierten (77,2%; Abb. 4.8), zeigten Eigenschaften, die gegensätzlich zu denen der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten waren: keine MHC-Klasse-II-Expression, auch nicht auf mRNA Ebene, und keine Expression kostimulatorischer Moleküle (Abb. 4.14 und 4.19). Sie sind als Stimulatorzellen weder für die Autostimulation (Abb. 4.9 und 4.12) noch für die Restimulierung (Abb. 4.18) von "naiven" T-Lymphozyten im T-Zellproliferationsassay geeignet.

## 6 Diskussion

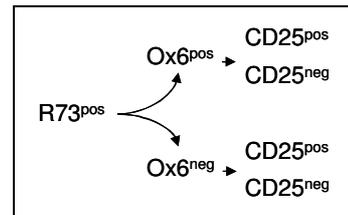
Nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 wurden antigenspezifische, MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten aus peripheren Lymphknoten isoliert und hinsichtlich ihrer Funktion im T-Zellproliferationsassay charakterisiert. Auch einige ihrer molekularbiologischen Eigenschaften, wie die Expression von MHC-Klasse-II und kostimulatorischen Molekülen, wurden untersucht.

### **6.1 Antigen-spezifische T-Lymphozyten lassen sich in MHC-Klasse-II-positive und -negative Zellen unterteilen**

Grundsätzlich scheint Übereinstimmung zu bestehen, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies wurde für verschiedene Spezies gezeigt, wie Ratte (Sopori ML et al., 1985), Maus (Michaelides M und McKenzie IF, 1981), Mensch (Evans RL et al., 1978), Rind (Isaacson JA et al., 1998), Pferd (Bendali-Ahcene S et al., 1997) und Kaninchen (Doveren RF et al., 1986). Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist, dass nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 sich zwei antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulationen unterscheiden lassen, nämlich MHC-Klasse-II-positive und -negative T-Lymphozyten. Entsprechend der für ihren Nachweis verwendeten Antikörper werden sie als R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> bzw. als R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten bezeichnet (Abb. 4.7).

Dass es sich bei den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten tatsächlich um antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten handelte, wurde im T-Zellproliferationsassay mit P1-beladenen dendritischen Zellen als Stimulatorzellen gezeigt (Abb. 4.10). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sowohl die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> als auch die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten proliferierten, wenn sie mit P1-beladenen syngenen dendritischen Zellen inkubiert wurden (Abb. 4.10). Die Frage, die sich stellt, ist, warum die Immunisierung mit P1 zu zwei unterschiedlichen T-Zellpopulationen führt. Möglicherweise handelt es sich bei den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten um Gedächtnis ("memory") -Zellen, die sich aus den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> entwickeln. Inwieweit jedoch die gefundenen Zellzahlen

-- der Anteil an  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten war ja wesentlich größer als der an  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten -- dieser Vorstellung widersprechen, ist noch zu untersuchen. Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nur ein geringer Anteil von 24% aktivierte  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten waren (Abb. 4.11). Möglicherweise handelt es sich nur bei den CD25-negativen Zellen um Gedächtniszellen (Hedfors IA und Brinchmann JE, 2003). Leider wurde nicht der Anteil der CD25-positiven und -negativen Zellen innerhalb der  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten bestimmt. Vermutlich befinden sich auch in dieser Population CD25-negative Zellen, was die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser Subgruppen (rechts im Diagramm) aufwirft.



Als nächstes wurden die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten als Stimulatorzellen im Proliferationsassay eingesetzt, wo sie eine vergleichbar starke T-Zellproliferation induzierten wie dendritische Zellen (Abb. 4.15 und 4.16). Zusätzlich wurde die Fähigkeit der  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten überprüft, sich gegenseitig antigenspezifisch zu restimulieren. Dies wird als Autostimulation bezeichnet. In beiden Fällen wurden die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten als Stimulatorzellen eingesetzt, jedoch sind einige experimentelle Unterschiede zu beachten: Für ihre Verwendung im Proliferationsassay wurden sie, ebenso wie dendritische Zellen, bestrahlt. Ihre Zellzahl betrug dabei standardmäßig 10.000 Zellen. Sie wurden mit dem Peptidantigen P1 beladen und anschließend mit 100.000 antigenspezifischen T-Lymphozyten, in der Regel nicht aufgereinigt, inkubiert. Zum Nachweis der Autostimulation wurde P1 zu nicht-bestrahlten  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten hinzugegeben (Abb. 4.9).

Der Vergleich der  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten mit „reifen“ dendritischen Zellen, als dem „Prototyp“ professioneller antigenpräsentierender Zellen, lässt vermuten, dass sie zusätzlich zu MHC-Klasse-II-Molekülen auch kostimulatorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies wird durch das Ergebnis der gemischten Leukozytenkultur unterstützt (Abb. 4.18). Dagegen waren  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten nicht in der Lage, eine T-Zellproliferation zu in-

duzieren (Abb. 4.9). Als Grund hierfür kann mit großer Wahrscheinlichkeit die fehlende MHC-Klasse-II-Expression gesehen werden, wodurch diesen Zellen die Fähigkeit fehlt, das synthetische Peptid P1 zu binden und zu präsentieren.

In der Literatur ist mehrfach dokumentiert, dass auch T-Lymphozyten die Funktion antigenpräsentierender Zellen übernehmen können (z.B. Barnaba et al., 1994). Auffallend ist, dass sämtliche Untersuchungen mit T-Zelllinien durchgeführt wurden (Bevan DJ und Crisholm PM, 1986; Broeren CPM et al., 1995; Kira J et al., 1989; Lorber ML et al., 1982; Mannie MD, 2001; Mannie MD und Norris MS, 2001; Mannie MD und Walker MR, 2001; Reizis B. et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> Zellen *in vivo* nach Immunisierung mit dem immunogenen Peptidantigen P1. Ihr Anteil an der Lymphozytenpopulation war sehr gering. Von 8,6x10<sup>7</sup> Lymphknotenzellen sind ca. 1x10<sup>5</sup> T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-positiv (Seite 29) und ca. 1,8x10<sup>7</sup> MHC-Klasse-II-negativ. Die weitere Charakterisierung der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten im Rahmen dieser Arbeit ergab folgende Unterschiede (Tab. 6.1).

**Tab. 6.1:** Vergleich der in dieser Arbeit nachgewiesenen Eigenschaften von R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> bzw. R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten. Die Gegenüberstellung verdeutlicht, dass sich die P1-spezifischen T-Lymphozyten in zwei Populationen mit unterschiedlichen Eigenschaften auftrennen lassen.

T-Lymphozyten	Anteil CD25 <sup>pos</sup> Zellen	Auto-stimulation	Stimulatorzellen im Proliferationsassay	Nachweis von mRNA	
				MHC-II	CD80/CD86
R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>pos</sup>	24% (Abb. 4.11)	Ja (Abb. 4.12)	Ja (Abb. 4.15 / 4.16)	Ja (Abb. 4.11)	Ja: CD86 (Abb. 4.19)
R73 <sup>pos</sup> , Ox6 <sup>neg</sup>	n.b. *)	Nein (Abb. 4.9 / 4.12)	Nein **) (Abb. 4.18)	Nein (Abb. 4.14)	Nein (Abb. 4.19)

\*) n.b.: nicht bestimmt; \*\*) in der gemischten Leukozytenkultur

Es ist akzeptiert, dass T-Lymphozyten zwei Signale zu ihrer Aktivierung benötigen (Agadjanyan MG et al., 1999). Das erste oder antigenspezifische Signal wird durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den Komplex aus MHC-Molekülen und den entsprechenden Antigenen ausgelöst. Das zweite antigen-unabhängige Signal kommt durch die Bindung der CD80/CD86-Moleküle auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen mit dem CD28-Rezeptor auf T-Lymphozyten zustande (Sharpe AH und Freeman J, 2002). Bei Abwesenheit dieser Kostimulation gehen T-Lymphozyten in einen Zustand der Anergie über, in dem sie nicht proliferieren und keine Zytokine, vor allem IL-2, sezernieren. Anergie wird dabei als partielle oder totale Nichtreaktivität aufgrund einer unzureichenden Aktivierung durch unvollständige oder fehlende Kostimulation bezeichnet (Quill H und Schwartz RH, 1987; Lechler RI et al., 2001). Das Phänomen Anergie beschreibt eine Vielzahl funktioneller Limitierungen bei der Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion (Mueller DL et al., 1991).

Die durch T-Lymphozyten vermittelte Antigenpräsentation wird als zentraler Schlüssel für die Hemmung der T-Zellaktivierung diskutiert (Mannie MD und Norris MS, 2001). Hierbei wurde immer wieder die Induktion von Anergie beobachtet (Celis E und Saibara T, 1992; Lamb JR et al., 1983; Lamb JR und Feldmann M, 1984; LaSalle JM et al., 1993; LaSalle JM et al., 1994; Pichler WJ und Wyss-Coray T, 1994; Satyaraj ES et al., 1994). Ein inhibierender Effekt bei der Antigenpräsentation durch die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet. Im Gegenteil, diese Zellen waren in der Lage, eine starke T-Zellantwort auszulösen (Abb. 4.15 und 4.16).

Somit lassen die eigenen Daten nicht den Schluss zu, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten Anergie induzieren. Die Präsenz dieser Zellen ist nicht als Indiz zu werten, dass zusätzlich zur allgemeinen Aktivierung im Rahmen der Alloimmunantwort auch inhibierende Vorgänge ablaufen.

## **6.2 Die antigenspezifischen $R73^{pos}$ , $Ox6^{pos}$ T-Lymphozyten aktivieren T-Lymphozyten**

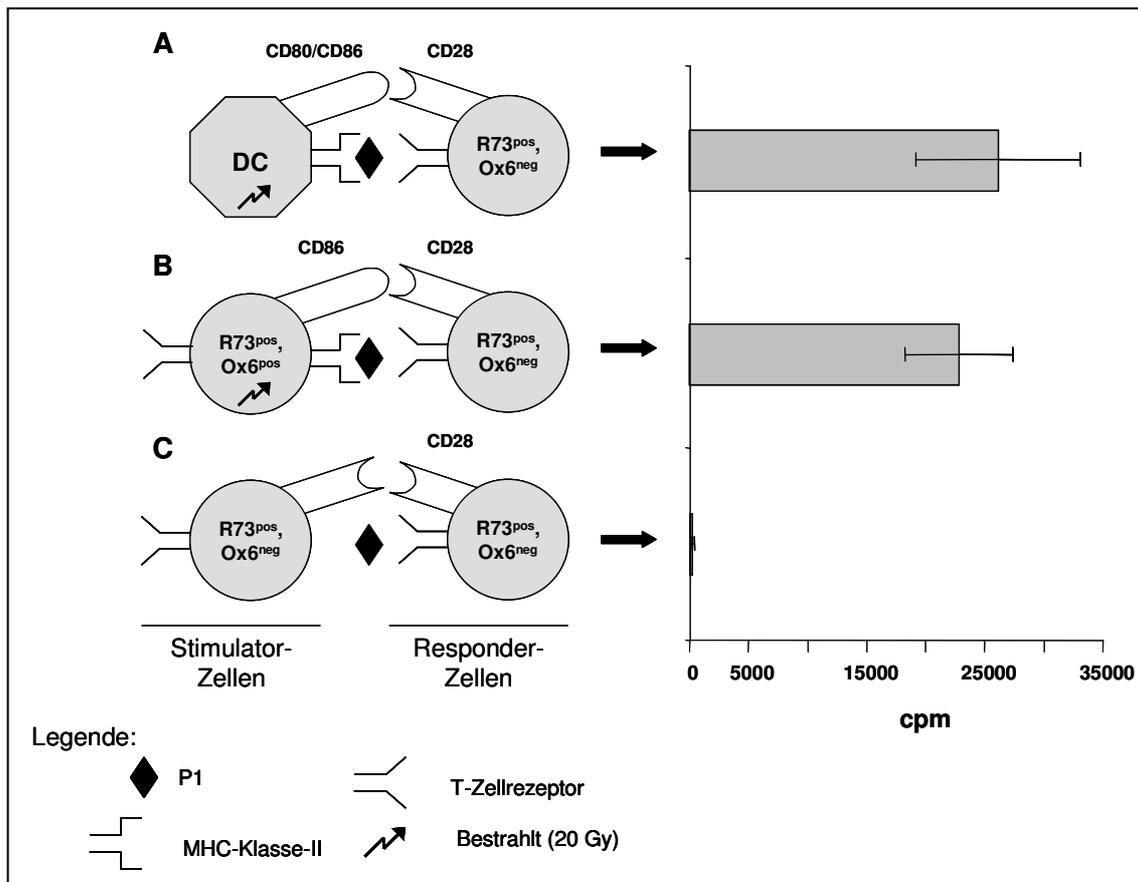
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden alloreaktive  $CD4^+$  T-Lymphozyten entweder über den direkten oder indirekten Weg der Alloantigenerkennung aktiviert (Lechler RI und Batchelor JR, 1982) (Abb. 1.2). Der direkte Weg wird in der gemischten Leukozytenkultur (Abb. 6.2) und der indirekte Weg im T-Zellproliferationsassay (Abb. 6.1) gemessen.

Beim direkten Weg erkennen alloreaktive T-Lymphozyten ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ ) des Transplantat-Empfängers direkt die allogenen MHC-Moleküle auf der Oberfläche der aus dem Transplantat ausgewanderten antigenpräsentierenden Zellen. Beim indirekten Weg hingegen nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers Spender-MHC-Moleküle auf, prozessieren diese und präsentieren die allogenen Peptidantigene über MHC-Klasse-II-Moleküle ihren "eigenen"  $CD4^+$  T-Lymphozyten (Auchincloss H et al., 1993; Auchincloss H und Sultan H, 1996). Die über den direkten oder indirekten Weg der Alloantigenerkennung aktivierten T-Lymphozyten steuern mit Hilfe ihrer Zytokine weitere, an der Transplantatzerstörung beteiligte Effektorzellen (siehe hierzu auch die Einleitung). In diesem Abschnitt wird der durch  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten ausgelöste direkte und indirekte Weg der Alloantigenerkennung näher betrachtet.

Abbildung 6.1 verdeutlicht, dass  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten sich hervorragend als Stimulatorzellen für den T-Zellproliferationsassay eignen (Abb. 6.1 B). Die Stärke der von ihnen induzierten T-Zell-Proliferation war dabei vergleichbar mit der Proliferation, die von dendritischen Zellen ausgelöst wurde (Abb. 6.1 A). Hingegen waren  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{neg}$  T-Lymphozyten als Stimulatorzellen ungeeignet (Abb. 6.1 C).

Weiter sind in Abbildung 6.1 die für eine Aktivierung notwendigen Moleküle schematisch dargestellt, soweit sie in der molekularbiologischen Analyse nachgewiesen wurden (Abb. 4.19). Während dendritische Zellen  $CD80$  und  $CD86$  positiv sind, wurde für die  $R73^{pos}$ ,  $Ox6^{pos}$  T-Lymphozyten nur  $CD86$  nach-

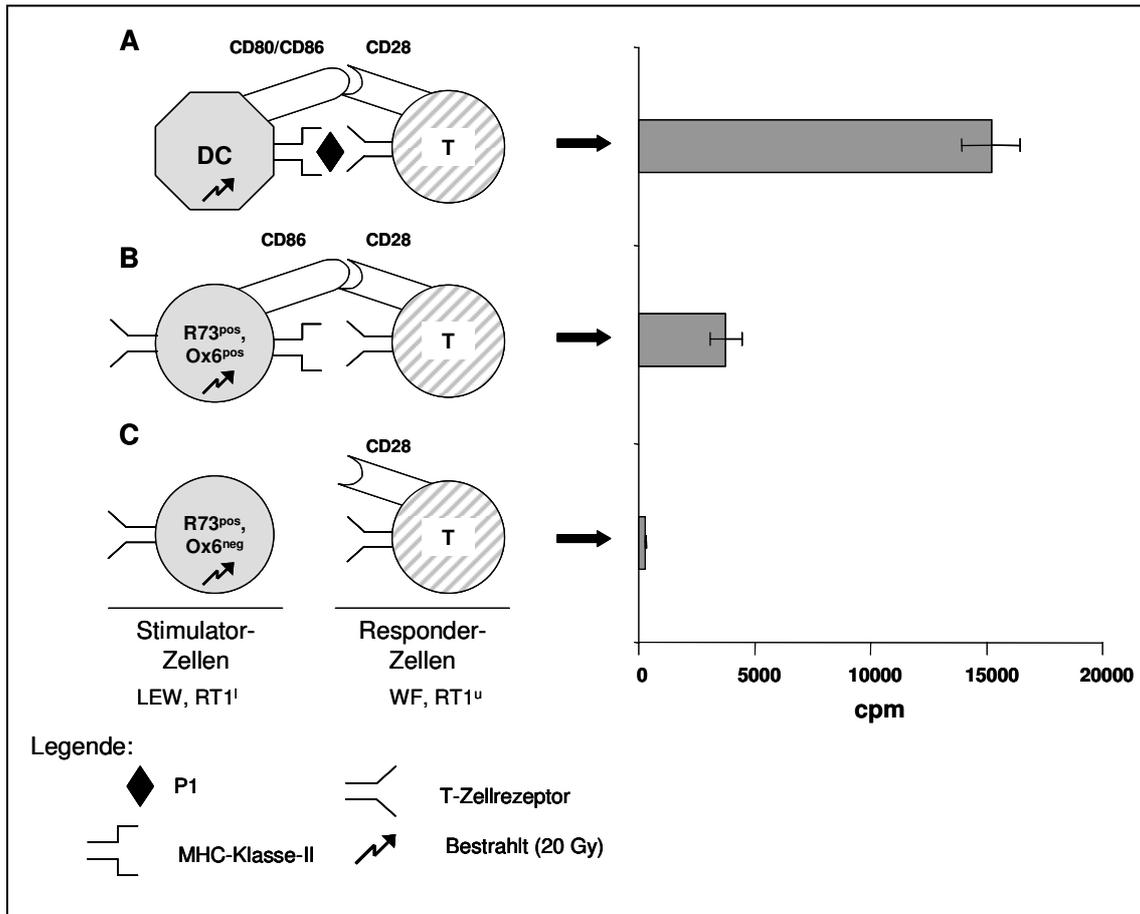
gewiesen. Da aber die beiden Zellpopulationen eine vergleichbare Proliferation induzierten, scheint die Abwesenheit von CD80 keine wesentlichen Auswirkungen für die Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten zu haben. Der Nachweis von CD86 auf der Zelloberfläche aktivierter T-Lymphozyten wurde in dieser Arbeit zwar nicht gezeigt (im Gegensatz zur CD86 mRNA), sie gilt aber als sicher (u.a. Azuma M et al., 1993).



**Abb. 6.1:** Schematische Darstellung der Situation im T-Zellproliferationsassay mit den verschiedenen Stimulatorzellen: (A) dendritische Zellen (DC), (B) R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten und (C) R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten. Während R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wie DC ausgezeichnete Stimulatorzellen zur Restimulation antigenspezifischer R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> darstellen (A und B), sind die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten als Stimulatorzellen für die Autostimulation (Abb. 4.9) ungeeignet (C). Als Erklärung hierfür wird die fehlende Oberflächenexpression von MHC-Klasse-II und CD86 gesehen.

In der Literatur werden zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben, wie T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle erhalten. Zum einen besitzen aktivierte T-Lymphozyten die Eigenschaft, MHC-Klasse-II-Moleküle von zum Beispiel antigenpräsentierenden Zellen aufzunehmen (Lorber MI et al., 1982). Zum anderen sind insbesondere aktivierte T-Lymphozyten von Ratte und Mensch in der Lage, MHC-Klasse-II-Moleküle zu synthetisieren (Lamb JR und Feldmann M, 1984). Sowohl die biologische Funktion dieser MHC-Klasse-II-Expression durch aktivierte T-Lymphozyten als auch die Kontrollmechanismen hierfür werden konträr diskutiert (Mannie MD et al., 2004). Wie bereits im Abschnitt 6.1 erläutert, wird der durch T-Lymphozyten vermittelten Antigenpräsentation eine wichtige regulatorische Funktion zugesprochen (Lamb JR und Feldmann M, 1984). So werden deaktivierende Vorgängen in den „Responder“-T-Lymphozyten ausgelöst, wie die Induktion von Apoptose durch „*activation-induced cell death*“ (O’Hehir RE et al., 1990) oder Anergie (Lamb JR et al., 1983; Lamb JR und Feldmann M, 1984; Celis E und Saibara T, 1992). Beide Vorgänge verhindern effektiv die Akkumulation aktivierter T-Lymphozyten (Pichler WJ et al., 1994).

Als gesichert gilt, dass T-Lymphozyten nicht in der Lage sind, selbst Antigene zu prozessieren. Experimente von Hewitt und Feldmann zeigen, dass antigenspezifische humane CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Gegenwart von Virusprotein-Fragmenten (Influenza HA, Aminosäure 306-330) proliferierten. Sie taten dies jedoch nicht in Gegenwart des gesamten Virusproteins (Hewitt CR und Feldmann M, 1989). Erst nach Zugabe antigenpräsentierender Zellen, die das Virusprotein prozessierten und als Peptidantigen präsentierten, begannen die T-Lymphozyten zu proliferieren. Ob die Aussage dieses Experiments auch für antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten anderer Spezies gilt, ist nicht bekannt.



**Abb. 6.2:** Schematische Darstellung der Situation in der gemischten Leukozytenreaktion ("mixed leukocyte reaction"). Bestrahlte dendritische Zellen (DC), R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> und R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten werden als Stimulatorzellen (jeweils  $1 \times 10^4$ ) mit  $1 \times 10^5$  T-Lymphozyten aus der Wistar Furth (WF) Ratte inkubiert. Die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> Zellen induzierten zwar eine deutliche Proliferation naiver WF-T-Lymphozyten (B), diese war jedoch wesentlich geringer als mit dendritischen Zellen (A). Dagegen induzierten R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten keine Proliferation (C).

Abbildung 6.2 zeigt, dass dendritische Zellen "naive" T-Lymphozyten in der gemischten Leukozytenkultur aktivieren. Im Gegensatz dazu induzierten die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten eine deutlich geringere Proliferation (Abb. 6.2 A und B:  $15.209 \pm 1.254$  cpm versus  $3.767 \pm 687$  cpm). Inwieweit als Ursache für die verringerte Proliferation die CD86 Expression auf den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten verantwortlich ist (Abb. 6.2 B), kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Ob die verringerte T-Zellproliferation Ausdruck einer unvollständigen T-Zellaktivierung oder Anergie ist, wie sie bei einer Antigenerkennung ohne Kostimulation beobachtet wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls nicht geklärt.

Andererseits sei daran erinnert, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten im T-Zellproliferationsassay eine vergleichbar starke Proliferation antigenspezifischer T-Lymphozyten induzierten wie dendritische Zellen (Abb. 4.16).

Das Konzept, dass T-Lymphozyten mehr als ein Signal zur vollständigen Aktivierung benötigen, wurde von Bretschner und Cohn (1970) vorgeschlagen, obwohl erst einige Jahre später Experimentaldaten dies sicher belegten. In Mäusen, die allogene Langerhans-Inseln oder Schilddrüsentransplantate erhielten, wurde gezeigt, dass nur bestimmte Zelltypen Moleküle zur Kostimulation exprimierten (Lafferty KJ und Gill RG, 1993). Ausschließlich diese "kostimulatorisch-aktiven" Zellen induzierten auch eine Abstoßung der MHC-differenten Transplantate. Zu diesen Zellen gehören antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen. Ihre Depletion reduziert die Immunogenität eines Organtransplantates und führt zu verlängerten Transplantatfunktionszeiten (Lafferty KJ et al., 1975; Lafferty KJ, 1980).

Untersuchungen mit modifizierten, zur Kostimulation unfähigen APC zeigen, dass sie nicht mehr in der Lage waren, T-Lymphozyten zu aktivieren. Des Weiteren unterschieden sich diese T-Lymphozyten deutlich von solchen T-Lymphozyten, die mit "normalen" APC in Kontakt gekommen waren (Jenkins MK und Schwartz RH, 1987; Quill und Schwartz, 1987). Wurden humane T-Zellklonen mit Antigen in Abwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen inkubiert, so wurden sie in Anergie überführt (Lamb JR et al., 1983; Lamb JR und Feldmann, M 1984). Anergie wird dabei als Zustand partieller oder totaler Nichtreaktivität aufgrund einer unzureichenden Aktivierung durch unvollständige oder fehlende Kostimulation bezeichnet (Quill H und Schwartz RH, 1987).

In verschiedenen Untersuchungen wurde die Bedeutung anergischer Zellen als Suppressorzellen gezeigt. Hierin unterscheiden sie sich eindeutig von indifferenten, ruhenden Zellen. Durch Injektion von Superantigenen ist es möglich, anergische Zellen mit suppressiven Eigenschaften zu induzieren (Kawabe Y und Ochi A, 1990; Rellahan BL et al., 1990). Der Zusammenhang zwischen A-

nergie und Suppressoraktivität wurde jedoch erst eindeutig gezeigt, als anergische humane T-Zellklone zu nicht anergischen T-Lymphozyten hinzugegeben wurden. Hierdurch wurde nämlich die Proliferation der nicht anergischen Zellen gehemmt (Lombardi G et al., 1994).

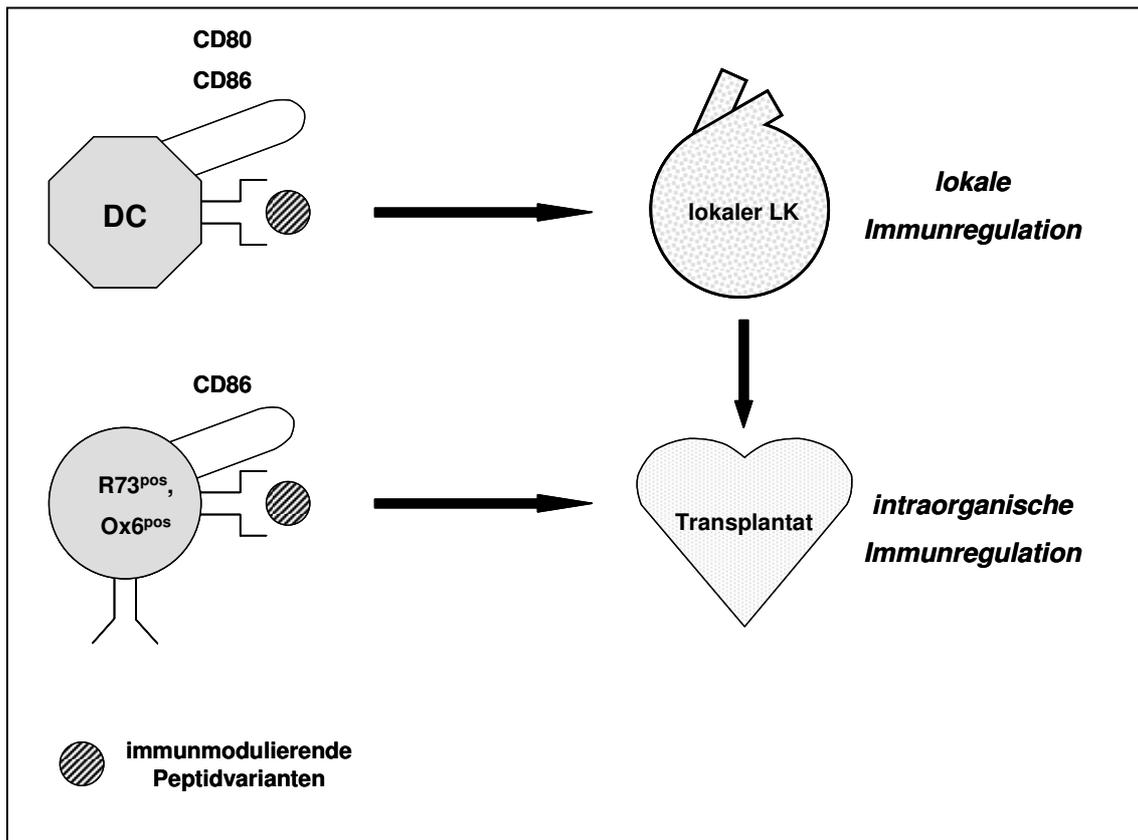
Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, welche Auswirkung die Antigenpräsentation durch R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten auf die T-Zellproliferation hat. Wurden sie als Stimulatorzellen im T-Zellproliferationsassay eingesetzt, mit dem der indirekte Weg der Alloantigenerkennung analysiert wird, so war eine deutliche Proliferation der Responderzellen zu beobachten (Abb. 4.15 und 4.16). Die Ergebnisse dieser Experimente lassen somit nicht den Schluss zu, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten hemmende Eigenschaften aufweisen. Die Frage, ob die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten Anergie in "naiven" T-Lymphozyten induzierten, wurde in der gemischten Leukozytenkultur untersucht (Abb. 4.18). Danach spricht einiges dafür, dass die Abwesenheit von CD80 auf der Zelloberfläche der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zu einer stark verminderten Proliferation der naiven T-Lymphozyten führte. Die Gründe hierfür müssen aber nicht zwangsläufig in der Induktion von Anergie liegen. Weitere Experimente hierzu werden Klarheit schaffen.

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist, dass sich nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 zwei antigenspezifische T-Zellpopulationen unterscheiden lassen, nämlich MHC-Klasse-II-positive und -negative T-Lymphozyten. Für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten (Abb. 4.7) wurde gezeigt, dass sie sich als ausgezeichnete Stimulatorzellen für P1-spezifische T-Lymphozyten erwiesen.

### Überlegungen für einen möglichen therapeutischen Ansatz mit R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten

Die Beobachtung, dass R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wie dendritische Zellen von außen, d.h. ohne Prozessierungsschritt durch die Zellen, mit synthetischen Peptiden beladen werden können, führte zu der Überlegung, ob sie nicht auch therapeutisch einzusetzen sind. Hierbei könnten sie bestimmte immunregulatorische Peptidvarianten zu den alloreaktiven T-Lymphozyten im Transplantat und mit Hilfe dieser Peptide die Immunantwort hemmen. Der Vorteil dieser Vorgehensweise wäre, dass mit Hilfe dieser Zellen auch im Transplantat die Immunantwort reguliert werden könnte. Dendritische Zellen suchen erst die Lymphknoten auf (Cerundolo et al., 2004), um eine von hier ausgehende zelluläre Immunsuppression zu induzieren. Des Weiteren ist nicht vollständig geklärt, ob eine inhibierende Immunantwort von hier aus wirksam wird. Zu dieser theoretischen Vorstellung sind bisher jedoch keine experimentellen Daten verfügbar.

Die in dieser Arbeit untersuchten R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten stellen somit eine hoch interessante Zellpopulation dar, die mit großer Wahrscheinlichkeit zu neuen Erkenntnissen in der Immunologie von T-Lymphozyten führen wird.



**Abb. 6.3:** Vorstellung für einen möglichen therapeutischen Ansatz mit R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten. Hierzu werden diese Zellen mit immunmodulierenden Peptidvarianten beladen. Im Gegensatz zu dendritischen Zellen wird erwartet, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten direkt in das Transplantat einwandern, um hier "intraorganisch" die Immunantwort zu hemmen.

## 7 Ausblick

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war der Nachweis, dass ein Teil der antigenspezifischen T-Lymphozyten sowohl MHC-Klasse-II als auch kostimulatorische Moleküle exprimieren. Diese Zellen, sie werden in dieser Arbeit als R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten bezeichnet, sind zur Autostimulation befähigt.

In der Literatur wird die Antigenpräsentation durch T-Lymphozyten mit regulatorischen Phänomenen in Verbindung gebracht. Die Daten in dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass es einen Unterschied gibt, ob R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten als Stimulatorzellen im Proliferationsassay oder in der gemischten Leukozytenreaktion eingesetzt werden. Während sie antigenspezifische T-Lymphozyten sehr gut stimulieren, scheinen sie bei der Aktivierung naiver T-Lymphozyten weniger effektiv zu sein (Abb. 6.2). Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Auswirkungen der Antigenpräsentation aktivierter T-Lymphozyten im Detail zu verstehen. Zusätzlich ist die Frage zu klären, ob antigenpräsentierende T-Lymphozyten der Ratte über die Fähigkeit verfügen, Antigene zu prozessieren.

Durch ihre geringe Anzahl an der Lymphknotenpopulation ist die Isolierung von R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zeitintensiv und aufwendig. Ein wesentlicher Fortschritt wäre, wenn sich diese Zellen *in vitro* unter dem Einfluss des Antigens kultivieren ließen. Dies wäre auch eine wesentliche Voraussetzung, um ausreichende Zellzahlen für umfangreiche Untersuchungen *in vitro* aber auch *in vivo* zur Verfügung zu haben. Dabei ist zu prüfen, inwieweit ihr Phänotyp stabil bleibt, oder ob sich die Zellen unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei ausbleibender Stimulation, zu R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup>, CD25<sup>neg</sup> T-Lymphozyten entwickeln, die möglicherweise Gedächtniszellen darstellen. Auch könnte geklärt werden, ob die ebenfalls in dieser Arbeit beschriebenen R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten eine eigenständige Population darstellen oder ob sie sich aus den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten entwickeln.

## 8 Zusammenfassung

T-Lymphozyten vermitteln sowohl die Transplantatabstoßung (Stichwort: alloreaktive T-Lymphozyten) als auch die Transplantatprotektion (Stichwort: regulatorische T-Lymphozyten). Für ihre Aktivierung benötigen die T-Lymphozyten entsprechende T-Zellantigene, die im Rahmen der Transplantation als Transplantations- oder Alloantigene bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich um die von den Zellen des Transplantates stammenden MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle. Diese werden von dendritischen Zellen aufgenommen und zerkleinert. Die im Rahmen der Prozessierung entstandenen Peptide werden zusammen mit Selbst-MHC-Klasse-II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und dort den eigenen T-Lymphozyten präsentiert. Die Auswirkungen dieser über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung vermittelten Aktivierung von T-Lymphozyten auf die Transplantatfunktion sind weitgehend bekannt: Die unter dem Einfluss alloreaktiver T-Lymphozyten induzierten Effektorzellen, wie zytotoxische T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen, sind an der Zerstörung des Transplantates beteiligt. Ungeklärt ist, ob im Rahmen der allogenen Immunaktivierung neben aktivierenden auch inhibierende T-Zell-Antworten entstehen. Hierzu ist es notwendig, die während einer allogenen Immunantwort aktivierten CD4+ T-Lymphozyten genauer zu untersuchen.

Ein wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass sieben Tage nach Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 zwei unterschiedliche Populationen an R73<sup>pos</sup> T-Lymphozyten zu unterscheiden waren. Sie wurden nach ihrer Fähigkeit, den anti-MHC-Klasse-II-Antikörper Ox6 zu binden, als R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> bzw. als R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten bezeichnet. Der Anteil der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten an der Lymphknotenpopulation war mit ca. 5% im Vergleich zu den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten mit 77% sehr gering. Nach Zugabe des Antigens P1 proliferierten ausschließlich die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten, während die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten für ihre Reaktivierung P1-beladene dendritische Zellen benötigten. Somit zeigten nur die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten Eigenschaften antigenpräsentierender

Zellen. Dies setzt neben der Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf der Zelloberfläche auch die Präsenz von Molekülen zur Kostimulation voraus.

Bei der Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten unterschieden sich die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten in ihrer Fähigkeit als Stimulatorzellen nicht von reifen dendritischen Zellen, als den potentesten antigenstimulierenden Zellen des Immunsystems. Wurden sie dagegen mit naiven T-Lymphozyten inkubiert, so war die induzierte T-Zellproliferation wesentlich schwächer als bei dendritischen Zellen: R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten:  $3.700 \pm 687$  cpm; dendritische Zellen:  $15.209 \pm 1.254$  cpm.

Sowohl für die Restimulation aktivierter T-Lymphozyten als auch für die Aktivierung naiver T-Lymphozyten ist es notwendig, dass die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> Zellen neben MHC-Klasse-II Molekülen auch kostimulatorische Moleküle exprimieren. Exklusiv für die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wurde spezifische mRNA für MHC-Klasse-II, dem kostimulatorischen Molekül CD86 und CIITA III in der RT-PCR nachgewiesen. Die MHC-Klasse-II Moleküle auf der Oberfläche der R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten sind wichtig, um eine Beladung mit Antigenen, in diesem Fall mit Peptid P1, zu ermöglichen. Die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen wird vom "Master-Regulator" MHC-II Transaktivator/Promotor oder CIITA reguliert. Nur in den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten wurde auch das Transkript für den Promotor III (CIITA III) erfolgreich nachgewiesen. Über CD86 vermitteln die R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten die Kostimulation.

Im Gegensatz zur allgemeinen Auffassung, wonach die durch T-Lymphozyten vermittelte Antigenpräsentation zur Induktion von Anergie führt, wurde diese Eigenschaft weder bei den R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>pos</sup> T-Lymphozyten noch R73<sup>pos</sup>, Ox6<sup>neg</sup> T-Lymphozyten beobachtet. Welche Bedeutung diesen Zellen bei der Transplantatabstoßung zukommt, ist zum jetzigen Zeitpunkt vollkommen ungeklärt. Ob sie z.B. für die Verstärkung der lokalen Immunantwort gegen das Transplantat benötigt werden, ist in weiterführenden Arbeiten zu untersuchen.

## 9 Literaturverzeichnis

- Agadjanyan MG**, Kim JJ, Trivedi N, Wilson DM, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, Chalian AA, Maldonado M A, Williams WV, Weiner DB. CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol* 1999; 162: 3417-3427
- Auchincloss H**, Lee R, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher H. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3373-3377
- Auchincloss H**, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 681-687
- Azuma M**, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL. Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 845-850
- Barnaba V**, Watts C, de Boer M, Lane P, Lanzavecchia A. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 71-75
- Bendali-Ahcene S**, Cadore JL, Fontaine M, Monier JC. Anti-alpha chain monoclonal antibodies of equine MHC class-II antigens: applications to equine infectious anemia. *Res Vet Sci* 1997; 62: 99-104
- Benichou G**, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 1999; 162: 352-358
- Ben-Nun A**, Lando Z, Dorf ME, Burakoff SJ. Analysis of cross-reactive antigen-specific T cell clones. Specific recognition of two major histocompatibility complex (MHC) and two non-MHC antigens by a single clone. *J Exp Med* 1983; 157: 2147-2153
- Bevan DJ**, Crisholm PM. Co-expression of CD4 and CD8 molecules and de novo expression of MHC class II antigens on activated rat cells. *Immunology* 1986; 59: 621-625
- Bjorkman PJ**, Saper MA, Samroui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506-512
- Bretschnner P**, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 1970; 169: 1042-1049
- Broeren CPM**, Wauben MHM, Lucassen MA, van Meurs M, van Kooten PJS,

- Boog CJP, Claassen E, van Eden W. Activated rat T cells synthesize and express functional major histocompatibility class II antigens. *Immunology* 1995; 84: 193-201
- Celis E**, Saibara T. Binding of T cell receptor to major histocompatibility complex class II-peptide complexes at the single-cell level results in the induction of antigen unresponsiveness (anergy). *Eur J Immunol* 1992; 22: 3127-3134
- Cerundolo V**, Hermans I F, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 2004; 5: 7-10
- Denton MD**, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353: 1083-1091
- Doveren RF**, van der Linden CJ, Spronken EE, Groenewegen G, Buurman WA: Canine MHC-class II antigens on B and T lymphocytes. *Tissue Antigens* 1986; 27: 87-98
- Evans RL**, Faldetta TJ, Humphreys RE, Pratt DM, Yunis EJ, Schlossman SF. Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens. *J Exp Med* 1978; 148: 1440-1445
- Fishman JA**, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741-1751
- Hariharan S**, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612
- Heeger PS**. T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am J Transplant* 2003; 3: 525-533
- Hedfors IA**, Brinchmann JE. Long-term proliferation and survival of in vitro-activated T cells is dependent on Interleukin-2 receptor signalling but not on the high-affinity IL-2R. *Scand J Immunol* 2003; 58: 522-532
- Hewitt CR**, Feldmann M. Human T cell clones present antigen. *J Immunol* 1989; 143: 762-769
- Isaacson JA**, Flaming KP, Roth JA. Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64: 235-248
- Jenkins MK**, Schwartz RH. Antigen presentation by chemical modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987; 165: 302-319

- Kawabe Y**, Ochi A. Selective anergy of V beta 8+ CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med* 1990; 172: 1065-1070
- Kira J**, Itoyama Y, Goto I. Generation of CD4+ blastoid T cells showing marked upregulation of CD4, class I and II MHC, and IL2 receptor molecules is required for the expression of potent encephalitogenicity. *Cell Immunol* 1989; 123: 264-275
- Kottenmeier S**. Immunbiologie der Transplantatabstoßung: Untersuchungen zur antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung in Ab- und Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen". Medizinische Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005
- Kuckein O**. Charakterisierung von CD4+ CD25+ T-Regulatorzellen der Ratte. Medizinische Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005
- Lafferty KJ**, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975; 188: 259-261
- Lafferty KJ**. Immunogenicity of foreign tissues. *Transplantation* 1980; 29: 179-182
- Lafferty KJ**, Gill RG. The maintenance of self-tolerance. *Immunol Cell Biol* 1993; 71: 209-214
- Lamb JR**, Skidmore BJ, Green N, Chiller JM, Feldmann M. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J Exp Med* 1983; 157: 1434-1447
- Lamb JR**, Feldmann M. Essential requirement for major histocompatibility complex in recognition in T cell tolerance induction. *Nature* 1984; 308: 72-74
- LaSalle JM**, Hafler DA. T cell anergy. *FASEB J* 1994; 8: 601-608
- LaSalle JM**, Toneguzzo F, Saadeh M, Golan DE, Taber R, Hafler D. T cell presentation of antigen requires cell-to-cell contact for proliferation and anergy induction. Differential MHC requirements for superantigen and autoantigen. *J Immunol* 1993; 151: 649-657
- Lechler RI**, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts: effect of including chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982; 156: 1835-1841
- Lechler RI**, Chai J, Marelli-Berg F, Lombardi G. The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance. *Immunol* 2001; 103: 262-269

- Liu Z**, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, Suci-Foca N. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med* 1993; 177: 1643-1650
- Lombardi G**, Sidhu S, Batchelor R, Lechler R I. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* 1994; 264: 1587-1589
- Lorber ML**, Locken R, Stall A M, Fitch F W. I-A antigen on cloned alloreactive murine T lymphocytes are acquired passively. *J Immunol* 1982; 128: 2798-2803
- Mannie MD**. T cell-mediated antigen presentation: a potential mechanism of infectious tolerance. *Immunol Res* 2001; 23:1-21
- Mannie MD**, Norris MS. MHC class-II-restricted antigen presentation by myelin basic protein-specific CD4+ T cells causes prolonged desensitization and outgrowth of CD4- responders. *Cell Immunol* 2001; 212: 51-62
- Mannie MD**, Walker MR. Feedback activation of T-cell antigen-presenting cells during interactions with T-cell responders. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 252-260
- Mannie MD**, Dawkins JG, Walker MR, Clayson BA, Patel DM. MHC class II biosynthesis by activated rat CD4+ T cells: development of repression in vitro and modulation by APC-derived signals. *Cell Immunol* 2004; 230: 33-43
- Michaelides M**, McKenzie IF. Detection of Ia alloantigens on phytohemagglutinin-stimulated T blast cells. *Transplantation* 1981; 31: 330-333
- Mueller DL**, Chiodetti L, Bacon PL, Schwartz RN. Clonal anergy blocks the response to IL-4, as well as the production of IL-2 in dual-producing helper T cell clones. *J Immunol* 1991; 147: 4118- 4125
- Muhlethaler-Mottet A**, Otten LA, Steimle V, Mach B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 1997; 16: 2851-2860
- O'Hehir RE**, Lamb JR. Induction of specific clonal anergy in human T lymphocytes by Staphylococcus aureus enterotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8884-8888
- Otto C**, Ulrichs K. The immunology of allograft rejection: A survey of current knowledge and a discussion of peptide-specific anti-rejection strategies. *Transplantationsmedizin* 2004; 16: 158-171
- Pichler WJ**, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994; 15: 312-315

- Quill H**, Schwartz RH. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative non-responsiveness. *J Immunol* 1987; 138: 3704-3709
- Ratcliffe PJ**, Dudley CR, Higgins RM, Firth JD, Smith B, Morris PJ. Randomised controlled trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet* 1996; 348: 643-648
- Rellahan BL**, Jones L A, Kruisbeek AM, Fry AM, Matis LA. In vivo induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* 1990; 172: 1091-1100
- Reizis B**, Schramm C, Cohen I R, Mor F. Expression of major histocompatibility complex class II molecules in rat T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2796-2802
- Rogers NJ**, Lechler RI. Alloreognition. *American Journal of Transplantation* 2001; 1: 97-102
- Rubin RH**. Opportunities and challenges in infectious disease research for the twenty-first century. *Neth J Med* 1998; 52: 289-294
- Satyraj ES**, Rath S, Bal V. Induction of tolerance in freshly isolated alloreactive CD4+ T cells by activated T cell stimulators. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2457-2461
- Shakhar G**, Lindquist RL, Skokos D, Dudziak D, Huang JH, Nussenzweig MC, Dustin ML. Stable T cell-dendritic cell interactions precede the development of both tolerance and immunity in vivo. *Nat Immunol* 2005; 6: 707-714
- Sharpe AH**, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126
- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Hierarchical immunogenicity of donor MHC class I peptides in allotransplantation. *Hum Immunol* 2002; 63: 871-879
- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Allogeneic core amino acids of an immunodominant allopeptide are important for MHC binding and TCR recognition. *Hum Immunol* 2004; 65: 817-825
- Sopori ML**, Perrone RS, Cherian S, Cross RJ, Kaplan AM. Immunoregulation in the rat: characteristics of a suppressor T cell that inhibits antigen-dependent cell proliferation. *J Immunol* 1985; 135: 80-86

- Steimle V**, Otten LA, Zufferey M, Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993; 75: 135-146
- Tolkoff-Rubin NE**, Rubin RH. Viral infections in organ transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 2060-2063
- Van den Berg TK**, Puklavec MJ, Barclay AN, Dijkstra CD. Monoclonal antibodies against rat leukocyte surface antigens. *Immunol Rev* 2001; 184: 109-116
- Wong AW**, Ghosh N, McKinnon KP, Reed W, Piskurich JF, Wright KL, Ting JP. Regulation and specificity of MHC2TA promoter usage in human primary T lymphocytes and cell line. *J Immunol* 2002; 169: 3112-3119
- Wong W**, Venetz JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M. 2005 Immunosuppressive Strategies in Kidney Transplantation: Which Role for the Calcineurin Inhibitors? *Transplantation* 2005; 80: 289-296
- Woodle ES**, Vincenti F, Lorber MI, Gritsch HA, Hricik D, Washburn K, Matas AJ, Gallichio M, Neylan J. A multicenter pilot study of early (4-day) steroid cessation in renal transplant recipients under simulect, tacrolimus and sirolimus. *Am J Transplant* 2005; 5: 157-166
- Zinkernagel RM**, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251(5475): 547-548.

---

## **Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:**

### **Poster**

Heeg A., Kottenmeier S., Kuckein O., Hein B., Tiurbe G.C., Thiede A., Ulrichs K., Otto C. Immunbiologie der Transplantatabstoßung. Charakterisierung alloreaktiver MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten. *14. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Rostock, 22. - 24. Sept. 2005*

### **Abstract**

Otto C, Heeg A, Kottenmeier S, Tiurbe GC, Thiede A, Ulrichs K. MHC class II mediated antigen presentation by alloreactive rat CD4 T cells does not induce regulatory properties. *Transplant Proc* 2006; 38: 755-756

---

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Christoph Otto durchgeführt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik, bedanken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie, danke ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die wertvollen Hinweise zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christoph Otto, Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie der Universität Würzburg, für die Überlassung des Themas und die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Die anregenden Diskussionen zu vielfältigen immunologischen Problemen, seine Geduld und nicht zuletzt seine moralische Unterstützung hatten maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Bianca Hein, Manuela Schneider und Christine Lesch, Technische Assistentinnen in der Experimentellen Transplantationsimmunologie, für ihre großartige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Versuche. Besondere Anerkennung gebührt ihnen ebenso für das sehr angenehme Arbeitsklima wie für die moralische Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, meiner Schwester, sowie meiner Großmutter für die andauernde moralische und finanzielle Unterstützung. Ohne sie wären das Studium der Humanmedizin und die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

---

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name André Heeg  
Geburtsdatum 27.01.1979  
Geburtsort Erlenbach a. M.

## Schulbildung

1985 – 1989 Grundschule Sommerkahl  
1989 – 1998 Hanns-Seidel-Gymnasium, Hösbach  
1998 Abitur

## Zivildienst

1998 – 1999 Rettungsdienst, Bayerisches Rotes Kreuz (Kreisverband Aschaffenburg)

## Hochschulausbildung

10/1999 – 09/2001 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
08/2001 Physikum  
10/2001 – 09/2005 Klinisches Studium  
08/2002 1. Staatsexamen  
09/2004 2. Staatsexamen  
09/2005 3. Staatsexamen

## Praktisches Jahr

10/2004 – 02/2005 Chirurgie: University of Melbourne, Royal Melbourne Hospital; Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Chirurgische Universitätsklinik  
02/2005 – 05/2005 Innere Medizin: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Universitätsklinik  
05/2005 – 09/2005 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Freiburg, 25.01.2007



André Heeg