

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

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

**Immunbiologie der Transplantatabstoßung:
Untersuchungen zur
antigenspezifischen T-Zell-Aktivierung
in An- und Abwesenheit
antigenpräsentierender Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Stefan Kottenmeier

aus Würzburg

Würzburg, Juni 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Herrmann
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2005

Der Promovend ist Arzt

*Diese Arbeit ist meinen Eltern
Juliane und Bernd Kottenmeier gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung	2
1.2	Der T-Zell-Proliferationsassay	4
1.3	Zielsetzung	5
2	FRAGESTELLUNG	6
3	MATERIAL UND METHODEN	7
3.1	Peptide	7
3.2	Tiere	8
3.3	Immunisierung	8
3.4	Kulturmedium und Pufferlösungen	9
3.4.1	Kulturmedium	9
3.4.2	Lysepuffer	9
3.4.3	PBS (Phosphate buffered saline)	9
3.5	T-Zell-Proliferationsassay	9
3.6	Auswertung	10
3.7	Zellisolierungen	11
3.7.1	Isolierung von Lymphknotenzellen	11
3.7.2	Isolierung von dendritischen Zellen	11
3.7.3	Isolierung von B-Lymphozyten	12
3.7.4	Isolierung von Makrophagen	13
3.8	Zellstimulierung mit Ionomycin und PMA	13
3.9	Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern	13
3.10	Durchflusszytometrie	14
4	ERGEBNISSE	15

4.1	T-Zell-Restimulierung in Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen	15
4.1.1	Charakterisierung der alloantigeninduzierten T-Zell-Proliferation.....	15
4.1.2	Der T-Zellproliferationsassay: Analyse sensitivitätsbestimmender Parameter.....	20
4.1.3	Bedeutung MHC-Klasse-II-exprimierender Zellen für die T-Zell-Restimulierung	24
4.2	T-Zell-Restimulierung in Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen	28
4.2.1	Nachweis der MHC-Klasse-II-Expression auf aktivierten T-Lymphozyten	29
4.2.2	MHC-Klasse-II-positive CD4+ T-Lymphozyten als Ursache der Autostimulation.....	30
4.2.3	Beeinflussung der Autostimulation: Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern.....	34
5	BEANTWORTUNG DER FRAGEN	41
6	DISKUSSION	44
6.1	Die T-Zell-vermittelte Antigenpräsentation.....	44
6.2	Die biologische Funktion MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten	46
6.3	MHC-Klasse-II-Moleküle auf T-Lymphozyten: Ein aktiver Mechanismus?	49
6.4	Überlegungen zu einem antigenspezifischen Therapiekonzept mit MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten	50
7	AUSBLICK	52
8	ZUSAMMENFASSUNG	53
9	LITERATURVERZEICHNIS	55
	APPENDIX	63

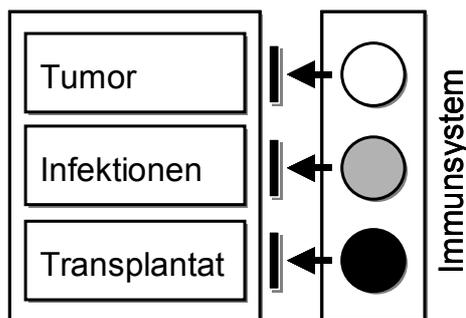
Abkürzungen

- APC: *antigen presenting cells* (antigenpräsentierende Zellen)
- cLNC: *cervicale lymph node cells* (cervikale Lymphknotenzellen)
- DC: *dendritic cells* (dendritische Zellen)
- FACS: *fluorescence-activated cell sorter* (Durchflusszytometer)
- IL-2R: Interleukin-2-Rezeptor
- LEW: Lewis Ratte
- LNC: *lymph node cells* (Lymphknotenzellen)
- mLNC: *mesenteric lymph node cells* (mesenteriale Lymphknotenzellen)
- MHC: *major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)
- NK: Natürliche Killerzellen
- 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 allogene Organtransplantation, d.h. die Übertragung zwischen genetisch nicht-identischen Individuen der gleichen Spezies, ist bei irreversiblen Organerkrankungen nach wie vor die Therapie der Wahl. Fortschritte bei den chirurgischen Operationstechniken, der MHC-Typisierung (Opelz G et al., 1977) und vor allem bei der Entwicklung von Immunsuppressiva (Henry ML, 1999) führten dazu, dass sich die Überlebensraten transplanteder Organe kontinuierlich verbesserten. So hat die Einführung des Calcineurininhibitors Cyclosporin A in die Klinik zu einer Steigerung der Ein-Jahres-Überlebensrate nach Nierentransplantation von etwa 64 Prozent Anfang der 80er Jahre auf 78 Prozent in den Jahren 1985-1989 geführt (Gjertson DW, 1991 und 1995). Inzwischen werden weitere Immunsuppressiva eingesetzt, doch ist allen gemeinsam, dass sie die Funktion des gesamten Immunsystems hemmen (Abb 1.1). Diese Strategie verhindert einerseits die Transplantatabstoßung, doch ist sie andererseits für schwerwiegende Infektionen und einem erhöhten Malignomrisiko verant-

(A) unter Immunsuppression



(B) unter antigenspezifischer Therapie

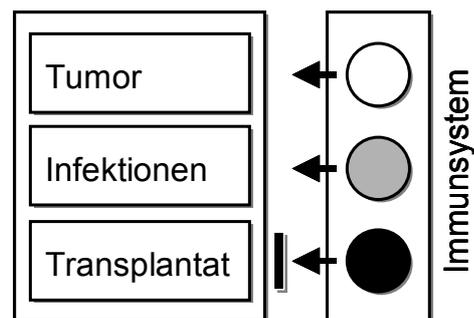


Abbildung 1.1: Darstellung der immunologischen Situation nach Organtransplantation unter (A) Immunsuppression und (B) einer antigenspezifischen Therapie. Immunsuppressiva schützen zwar das Transplantat vor der Abstoßung, doch hierzu hemmen sie die lebenswichtige Immunabwehr. In einem nicht-immunsupprimierten Organismus schützt die Immunabwehr vor Infektionen und Tumoren. Das Ziel einer antigenspezifischen 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.

wortlich (Walz MK, 1992; Cobbold SP, 2005). Hinzu kommt, dass diese Immunsuppressiva über toxische Nebenwirkungen wie Nephro- und Neurotoxizität verfügen (Shapiro R, 1991; Hong JC, 2000). Das große Ziel der Transplantationsimmunologie ist daher, Therapien zu entwickeln, die ausschließlich die gegen das allogene Organ gerichtete Immunantwort selektiv hemmen (Gorantla VS et al., 2000). Als wesentlich für solche antigenspezifischen Ansätze wird die gezielte Beeinflussung der CD4⁺ Helfer-T-Lymphozyten gesehen. Sie werden in erster Linie durch die sogenannten Transplantat- oder Alloantigene aktiviert; hierunter werden vor allem die besonders polymorphen Moleküle des MHC-Komplexes zusammengefasst (Bjorkman PJ et al., 1987). Die Funktion der alloreaktiven CD4⁺ 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). Sollte es gelingen, diese T-Lymphozyten gezielt zu hemmen, so sollte auch die von ihnen initiierte zelluläre Zerstörung zu verhindern sein. Um den Zusammenhang zwischen MHC-Antigenen und der Aktivierung alloreaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten darzustellen, werden im folgenden Abschnitt die Aktivierungswege von T-Lymphozyten nach allogener Transplantation erläutert.

1.1 Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung

Lechler und Batchelor vertraten als Erste die Ansicht, dass Alloantigene in der Lage sind, die T-Lymphozyten des Empfängers über zwei unterschiedliche Wege zu aktivieren: Über den „direkten“ und „indirekten Weg“ der Alloantigenerkennung (Lechler RI et al., 1982). Bei dem direkten Weg erkennen CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten die MHC-Klasse-I bzw. MHC-Klasse-II Moleküle auf der Zelloberfläche von Spenderleukozyten und werden hierdurch aktiviert. Unter den Spenderleukozyten, auch „passenger leukocytes“ genannt, sind in erster Linie die antigenpräsentierenden Zellen von Bedeutung, da sie auch die notwendigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren (Haspot F et al., 2002). Die-

Der direkte Weg der Alloantigenerkennung wird damit erklärt, dass die T-Zell-Rezeptoren bestimmter T-Zell-Subfamilien eine Kreuzreaktivität für allogene MHC-Moleküle aufweisen (Lombardi G et al., 1990; Lechler RI et al., 1990). Ungefähr 1-10 Prozent der Empfänger-T-Lymphozyten erkennen so die Alloantigene (Sherman LA und Chattopadhyay S, 1993; Succhin EJ et al., 2001). Mit dem nahezu vollständigen Verschwinden der „passenger leukocytes“ kurze Zeit nach Transplantation verliert dieser Weg jedoch seine Bedeutung für die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten.

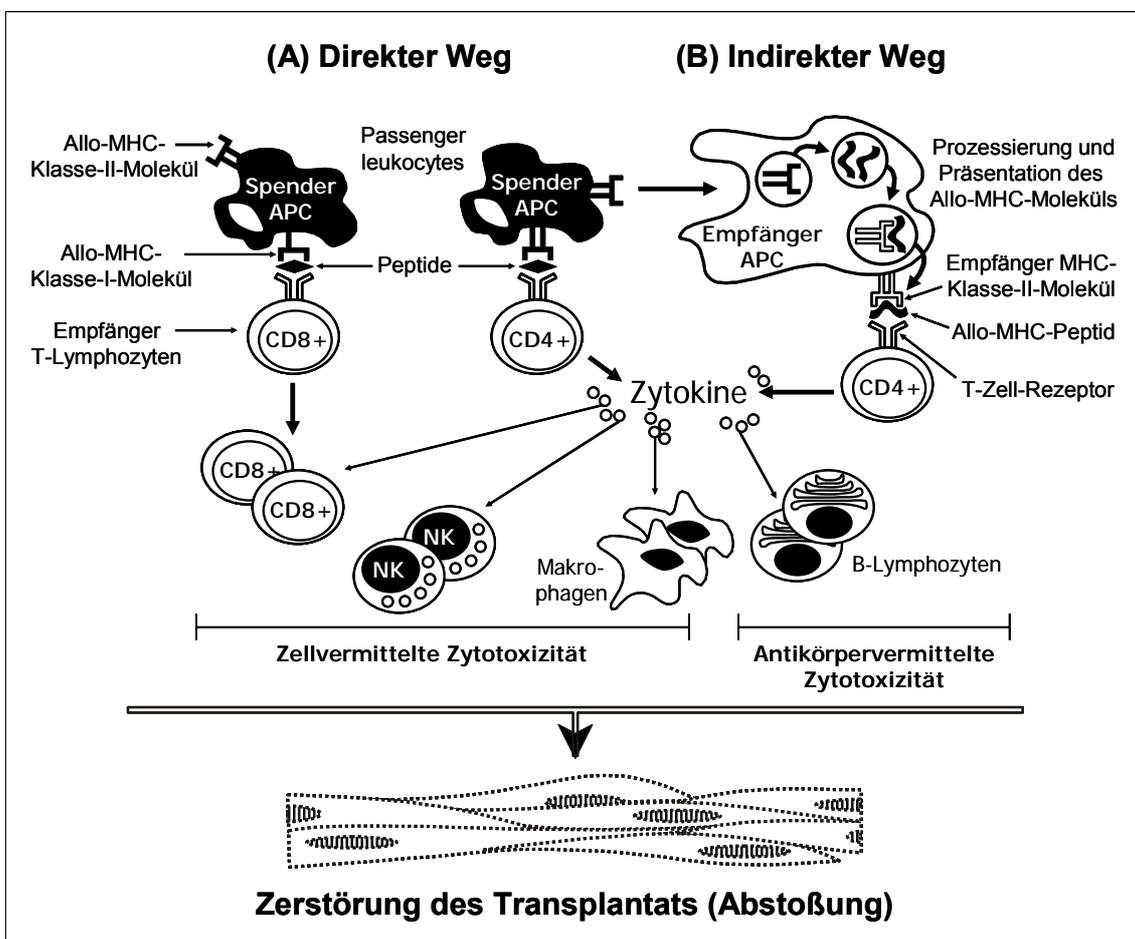


Abbildung 1.2: Die beiden Wege zur Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten des Empfängers: Der direkte (A) und indirekte (B) Weg der Alloantigenerkennung. Der direkte Weg ist durch die Interaktion antigenpräsentierender Zellen (APC) mit den Empfänger-T-Lymphozyten charakterisiert. Dagegen werden beim indirekten Weg die MHC-Moleküle des Spenders von Empfänger-APC aufgenommen, prozessiert und den eigenen T-Lymphozyten präsentiert.

Der indirekte Weg der Alloantigenerkennung stellt die zweite Möglichkeit dar, um allogene T-Lymphozyten nach Transplantation zu aktivieren. Dabei nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers von der Zelloberfläche abgeschilferte allogene Proteine über Endozytose auf und zerlegen sie in Bruchstücke, die anschließend über Selbst-MHC-Klasse-II-Moleküle den eigenen T-Lymphozyten präsentiert werden. Unter ihnen befinden sich auch Bruchstücke von allogenen MHC-Molekülen (Benichou G et al., 1992; Auchincloss H et al., 1993; Auchincloss H et al., 1996). Auch die über diesen Weg aktivierten CD4+ T-Lymphozyten steuern ihrerseits weitere Effektorzellen (Abb. 1.2).

Die Antigenpräsentation als Voraussetzung zur Induktion einer T-Zell-spezifischen Immunantwort wurde lange Zeit für eine spezielle Funktion von professionellen antigenpräsentierenden Zellen gehalten. Inzwischen weiß man jedoch, dass auch CD4+ T-Lymphozyten nach ihrer Aktivierung MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und zur Antigenpräsentation befähigt sind (Barnaba V et al., 1994; Broeren CP et al., 1995; Mannie MD et al., 2004). Diese durch T-Lymphozyten vermittelte Antigenpräsentation bezeichnet man als Autostimulation und weist besondere Eigenschaften auf, wie z.B. die Induktion von Anergie (Mannie MD, 2001). Dies wurde jedoch bisher nur *in vitro* an T-Zelllinien beobachtet und es ist nicht klar, ob dieser Effekt auch *in vivo* auftritt.

1.2 Der T-Zell-Proliferationsassay

Mit dem sogenannten T-Zell-Proliferationsassay lässt sich die Stärke der über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung induzierten T-Zell-Proliferation messen. Hierbei wird sich die besondere Eigenschaft der MHC-Klasse-II-Moleküle zunutze gemacht, dass diese auch von außen mit synthetischen Peptiden beladen werden können.

Diese Eigenschaft der MHC-Klasse-II-Moleküle wurde auch in der vorliegenden Arbeit genutzt. Der T-Zell-Proliferationsassay bildet dabei das Kernstück dieser

Arbeit und funktioniert folgendermaßen: Durch Immunisierung einer Lewis-Ratte mit einem synthetischen Peptid (s. Kapitel 3.1) werden antigenspezifische CD4⁺ T-Lymphozyten induziert. Die T-Lymphozyten werden aus den lokalen Lymphknoten isoliert und mit syngenen dendritischen Zellen *in vitro* inkubiert, die zuvor mit dem gleichen Peptid beladen wurden, das auch zur Immunisierung verwendet wurde. Diese Restimulation der antigenspezifischen T-Lymphozyten wird über den Einbau von radioaktivem Thymidin quantifiziert. Der T-Zell-Proliferationsassay ist streng antigenspezifisch und basiert auf dem immunologischen Gedächtnis aktivierter T-Lymphozyten. Naive T-Lymphozyten werden in diesem Assay nicht aktiviert. Als Antigen wurde in dieser Arbeit das synthetische Peptid P1 verwendet, das mit einem Bereich des MHC-Klasse-I-Moleküls der Wistar Furth (WF)-Ratte identisch ist (Abb. 3.2). Charakteristisch für P1 ist, dass es eine starke T-Zellantwort in Lewis-Ratten induziert. Erhalten nämlich mit P1 immunisierte Lewis-Ratten ein WF-Transplantat, so wird das Organ von dem Immunsystem dieser Tiere beschleunigt abgestoßen (Sitaru AG, 2003). Aus diesem Grund wurde P1 als Modellantigen für diese Untersuchungen gewählt.

1.3 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob nach einer induzierten Immunantwort *in vivo* MHC-Klasse-II-positive CD4⁺ T-Lymphozyten entstehen, die zur Auto-stimulation befähigt sind. Ihre mögliche Funktion als antigenpräsentierende Zellen wurde *in vitro* intensiv untersucht (Abschnitte 4.1.3, 4.2.1 und 4.2.2). Außerdem sollten Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern zeigen, wie die Autostimulation beeinflusst werden kann (Abschnitt 4.2.3). Auch bestimmte Parameter des hier verwendeten Proliferationsassays wurden überprüft (4.1.2), und die Auswirkungen der Immunisierung mit dem Modellantigen P1 (s. oben) auf die lokale Lymphknotenpopulation analysiert (Abschnitt 4.1.1).

2 Fragestellung

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

1. Das allogene Peptid P1 aktivierte nach subkutaner Applikation das Immunsystem der Lewis-Ratte. Welche Auswirkung hatte diese Immunisierung auf die Lymphozytenpopulation in den lokalen Lymphknoten?
2. Im T-Zell-Proliferationsassay wurde die *in vitro* Proliferation restimulierter antigenspezifischer T-Lymphozyten in Gegenwart von antigenpräsentierenden Zellen bestimmt.
 - a) Welche sind die Charakteristika dieses Assays?
 - b) Was sind die sensitivitätsbestimmenden Parameter?
3. Nach der Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 entstanden T-Lymphozyten, die MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimierten.
 - a) Welche Eigenschaften im T-Zell-Proliferationsassay sind für diese Zellen charakteristisch?
 - b) Lassen sich kostimulatorische Oberflächenmoleküle identifizieren, die an der Autostimulation beteiligt sind?

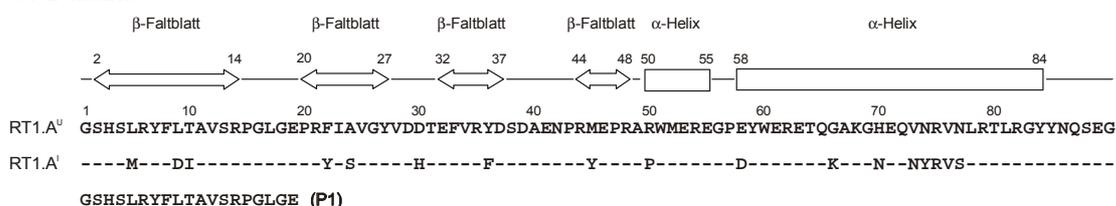
3 Material und Methoden

3.1 Peptide

Das Peptid P1 gehört zu einer Gruppe von sieben Wistar-Furth (Haplotyp: RT1.A^U) MHC-Klasse-I-Peptiden, deren Immunogenität bereits in früheren Arbeiten untersucht wurde (Sitaru AG et al., 2002 und 2004). P1, bestehend aus 19 Aminosäuren (Aminosäuren 1-19, s. Abb. 3.1), induzierte dabei eine besonders starke Immunantwort in Lewis-Ratten und wurde deshalb für diese Arbeit als Modellantigen ausgewählt. Als Kontrolle diente das 15 Aminosäuren umfassende Peptid Pc (Aminosäuren 110-124, Abb. 3.1). Pc stammt aus einem Abschnitt des MHC-Klasse-I Moleküls, der bei Lewis- und Wistar-Furth-Ratten identisch ist (s. Abb. 3.1). Die Synthese dieser beiden Peptide erfolgte nach publizierten Aminosäuresequenzen (Joly E et al., 1995; Chowdhury NC et al.,

Wistar-Furth MHC-Klasse-I: RT1.A^U (Spender)
 Lewis MHC-Klasse-I: RT1.A^I (Empfänger)

α1-Domäne



α2-Domäne

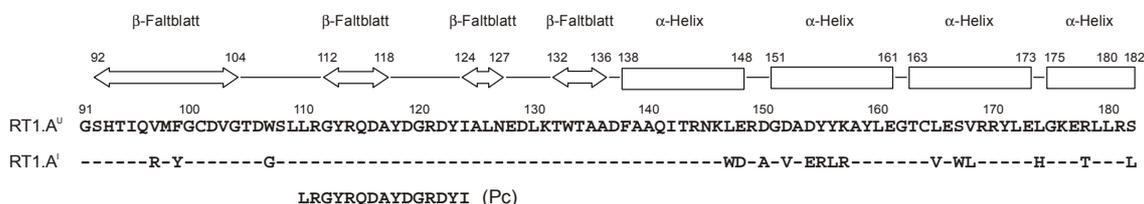


Abbildung 3.1: Aminosäuresequenz der Wistar-Furth (RT1.A^U) und LEW (RT1.A^I) MHC-Klasse-I-Moleküle. Von RT1.A^I sind nur die Aminosäuren dargestellt, die sich von RT1.A^U unterscheiden. Die Sequenzen der Peptide P1 und Pc sind ebenfalls abgebildet (nach Bjorkman PJ et al., 1987).

1998) durch die Firma Jerini AG (Berlin, Deutschland). Die Reinheit lag bei 95%. Die Abbildung 3.2 zeigt die Lage von P1 im WF-MHC-Klasse-I Molekül.

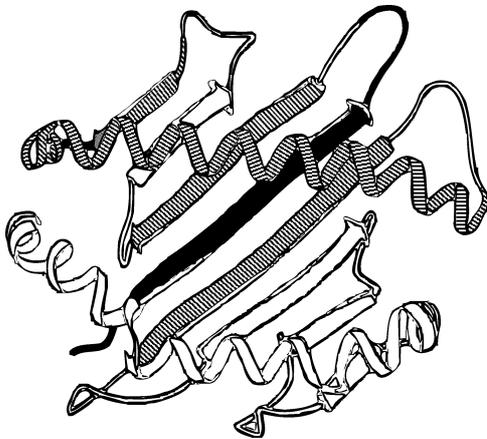


Abbildung 3.2: Der extrazelluläre Bereich des MHC-Klasse-I-Moleküls mit der Peptidbindungstasche. Das Antigen P1 „entstammt“ dem ersten β -Faltblatt der α 1-Domäne (schwarz unterlegt).

3.2 Tiere

Verwendet wurden 8-12 Wochen alte, 150-200g schwere männliche Lewis- (LEW, RT1^l) und Wistar-Furth- (WF, RT1^u) Ratten. Die Lieferung der beiden Inzucht-Rattenstämme erfolgte durch die Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland).

3.3 Immunisierung

100 μ g Peptid einer 1 mg/ml Stamm-Lösung wurde mit 100 μ l eines Adjuvans (TiterMax, Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland) gemischt. Anschließend wurden je 50 μ l dieser Emulsion Lewis-Ratten subkutan in die Sohlen der Hinterfüße injiziert. Vor jeder Immunisierung wurden die Tiere mit Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) für 5 Minuten betäubt. 7 Tage nach Immunisierung wurden die poplitealen Lymphknoten isoliert.

3.4 Kulturmedium und Pufferlösungen

3.4.1 Kulturmedium

Das Standard-Kulturmedium bestand aus RPMI 1640, das 20 mM HEPES, 1 mM Natrium-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 10% fetales Kälberserum (Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland) enthielt (alle Angaben als Endkonzentration).

3.4.2 Lysepuffer

Der Puffer zum Lysieren von Erythrozyten setzte sich aus 1,68 M Ammoniumchlorid, 99,88 mM Kaliumhydrogencarbonat und 12,6 mM EDTA zusammen. Da der Puffer 10-fach konzentriert war, wurde er vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

3.4.3 PBS (Phosphate buffered saline)

Der PBS-Puffer enthielt 140 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 7,2 mM Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat und wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

3.5 T-Zell-Proliferationsassay

Der T-Zell-Proliferationsassay wurde in Zellkultur-Mikroplatten mit 96 Rundboden-Vertiefungen („96-well-Platten“) von Greiner Bio-One, Frickenhausen, durchgeführt. Popliteale Lymphknotenzellen (jeweils 10^5 Zellen pro Vertiefung) wurden ohne weitere Aufreinigung mit 20 Gray bestrahlten syngenen DC (10^4 Zellen pro Vertiefung) und 5 µg Peptid P1 pro Vertiefung (= 33 µg/ml) in einem Endvolumen von jeweils 150 µl inkubiert. Die Platten wurden für 3 Tage bei

37°C und 5% CO₂-Sättigung kultiviert. Die letzten 6 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 µCi/Vertiefung [³H]-Thymidin inkubiert („gepulst“). Der [³H]-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).

3.6 Auswertung

Um die Daten verschiedener Experimentalserien miteinander vergleichen zu können, wurden sie als Stimulationsindex (SI) nach folgender Formel umgerechnet: $SI = \text{cpm [Experiment]} / \text{cpm [Kontrolle]}$. Bei dieser Kontrolle handelte es sich um popliteale Lymphknotenzellen („popliteale lymph node cells“ oder „pLNC“) in Abwesenheit P1-beladener dendritischer Zellen. Zusätzlich zu dieser, für die Berechnung des SI-Wertes wichtigen Kontrolle, wurden weitere Kontrollen durchgeführt: So lag der Stimulationsindex von pLNC inkubiert mit Pc-beladenen dendritischen Zellen in der Größenordnung unbelasteter dendritischer Zellen ($1,77 \pm 0,21$; $n=5$ vs. $1,70 \pm 0,30$; $n=42$), während dendritische Zellen allein einen sehr niedrigen SI von $0,05 \pm 0,03$ ($n=22$) aufwiesen. Somit wurden SI-Werte, die unter dem Wert von 1,7 lagen, als Hintergrund gewertet.

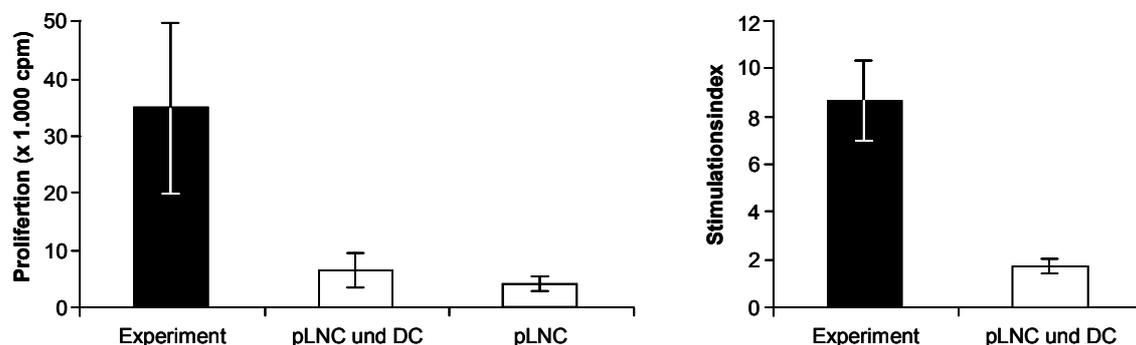


Abbildung 3.3: T-Zell-Proliferation P1-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Vergleich der Proliferation dargestellt als cpm-Werte und als dimensionsloser Stimulationsindex.

Abbildung 3.3 vergleicht die in „cpm“ angegebene Proliferation mit dem dimensionslosen Stimulationsindex: Eine Proliferationsstärke von durchschnittlich etwa 35.000 cpm und einem Kontrollwert von ca. 4.000 cpm ergibt einen Stimulationsindex von 8,7 (siehe auch Daten im Appendix). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden wie folgt berechnet: Pro Experiment repräsentierten wenigstens sechs Parallelwerte eine Messreihe. Wurde das Experiment nicht wiederholt ($n=1$), so wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus diesen 6 Parallelwerten errechnet. Wurde hingegen das Experiment wiederholt ($n>2$), so bildeten sämtliche Werte die Grundlage zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

3.7 Zellisolierungen

3.7.1 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 sie durch ein Sieb („Cell Strainer“ der Firma Falcon) gepresst. Nach dieser mechanischen Isolierung wurden die Zellen zweimal „gewaschen“ (d.h. die Zellen wurden abzentrifugiert, und das Zellpellet erneut in PBS oder Kulturmedium resuspendiert). Zum Abschluss wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mit der Neubauer-Kammer bestimmt. Hierzu wurden sie mit 0,04% Trypanblau (Endkonzentration) versetzt.

3.7.2 Isolierung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen aus den Milzen naiver Lewis-Ratten dienen als syngene antigenpräsentierende Zellen. Hierzu wurde die Milz aseptisch entnommen, durch ein Sieb 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 3-minütigen Inkubation die Zellsuspension durch ein weiteres Zellsieb („Cell Strainer“, siehe oben) filtriert, um Gewebefragmente aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI 1640 „gewaschen“ und über Nacht bei einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen pro Petrischale mit 15 ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden gesammelt, auf 14,5% Metrizamid (Linaris, Biologische Produkte GmbH, Wertheim) überführt und 13 Minuten bei 1823 xg und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Die angereicherten dendritischen Zellen wurden vorsichtig aus der Interphase entnommen, gewaschen und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Vor ihrer Anwendung als antigenpräsentierende Zellen wurden sie mit 20 Gray bestrahlt (Gammastrahler, Institut für Strahlenkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg). Pro Milz wurden durchschnittlich $2,5 \times 10^6$ dendritische Zellen isoliert (n=31).

3.7.3 Isolierung von B-Lymphozyten

B-Lymphozyten aus der Milz naiver Lewis-Ratten wurden ebenfalls als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. Hierzu wurden die isolierten Milzleukozyten (Technik siehe oben) auf 2×10^7 Zellen/ml PBS eingestellt. Für 1×10^6 B-Lymphozyten (ihr Anteil wurde durchflusszytometrisch ermittelt) wurden 0,3 µg des Antikörpers OX33 (Linaris, Wertheim, Deutschland) eingesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und erneut auf 2×10^7 Zellen/ml PBS eingestellt. Pro Zielzelle wurden zwei paramagnetische Dynalbeads (CELLection Pan Mouse IgG Kit der Firma DYNAL, Hamburg, Deutschland) kalkuliert, und dieser Ansatz für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die markierten B-Lymphozyten durch einen Magneten von den übrigen Zellen abgetrennt. Zur Entfernung der Dynalbeads wurden die Zellen in 200 µl Kulturmedium aufgenommen und für 15 Minuten mit 5 µl DNase (50 U DNase/µl; DYNAL, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Die zwischen den magnetischen Partikeln und den Pan-anti-Maus-Antikörpern befindlichen DNA-Spacer wurden durch die DNase zerschnitten. Somit

tragen die von den Dynalbeads freigesetzten B-Lymphozyten zusätzlich zum OX33 noch den Pan-anti-Maus-Antikörper auf ihrer Zelloberfläche. Um mögliche falschpositive Ergebnisse in durchflusszytometrischen Analysen zu vermeiden, wurde dieser Pan-Anti-Maus-Antikörper abgesättigt. Hierzu wurden 10^7 Zellen in 1 ml PBS mit 50 μ l Mausserum 20 Minuten bei 4°C inkubiert, zweimal „gewaschen“ und anschließend in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Positivselektion von T-Lymphozyten und MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten wurde in gleicher Weise mit dem Antikörper R73 bzw. mit der Kombination aus R73 und OX6 durchgeführt.

3.7.4 Isolierung von Makrophagen

Auch Makrophagen wurden als antigenpräsentierende Zellen untersucht. Sie wurden ebenfalls aus Milzen naiver Lewis-Ratten gewonnen. Die Milzleukozyten (siehe Abschnitt 3.6.2) wurden auf 2×10^7 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt, und die Zellen für mindestens 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei der Isolierung der Makrophagen wurde ihre Fähigkeit genutzt, auf Kunststoffoberflächen zu adhären. Mit einem sterilen Gummischaber wurden die am Boden von Petrischalen haftenden Makrophagen geerntet.

3.8 Zellstimulierung mit Ionomycin und PMA

Zur Zellstimulierung wurden 2×10^6 Zellen pro ml Kulturmedium mit 500 μ g/ml Ionomycin (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) und 10 ng/ μ l des Phorbol-esters PMA (Sigma-Adrich, Taufkirchen, Deutschland) über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung inkubiert (Angaben als Endkonzentration). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen.

3.9 Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern

Für die Blockierungsversuche wurden die unkonjugierten monoklonalen Antikörper (alle Linaris, Wertheim, Deutschland) OX6 (anti-RT1.B), OX17 (anti-

RT1.D), OX18 (anti-RT1.A), NDS61 (anti-IL-2R) und JJ319 (anti-CD28) verwendet. Jeweils 1×10^5 popliteale Lymphknotenzellen (Kapitel 3.6.1) wurden mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen (50, 10, 1 und 0,1 $\mu\text{g/ml}$) in den Vertiefungen einer Zellkultur-Mikroplatte für 45 Minuten bei 4°C inkubiert (Endvolumen 100 μl). Anschließend wurde die Platte bei 402 xg für 6 Minuten zentrifugiert. Nichtgebundene Antikörper wurden mit dem Überstand entfernt. Hierzu wurden 50 μl Überstand abgenommen und 50 μl Kulturmedium zugegeben. Die mit Antikörpern beladenen Zellen wurden anschließend im Proliferationsassay getestet.

3.10 Durchflusszytometrie

Jeweils 5×10^5 Zellen wurden mit der zuvor austitrierten Konzentration monoklonaler Antikörper für 15 Minuten bei 4°C in 50 μl PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 200 μl PBS gewaschen (s. oben). Die Maus-Anti-Ratte Antikörper (alle Linaris, Wertheim, Deutschland) waren entweder mit Fluorescein-Isotiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugiert: OX6 (anti-RT1.B), OX8 (anti-CD8 α), OX18 (anti-RT1.A), OX33 (anti-CD45RA, B-Zellen), OX39 (anti-CD25), R73 (anti-TCR $\alpha\beta$) und W3/25 (anti-CD4) (Übersicht bei van den Berg TK et al., 2001). Mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) (Becton Dickinson Pharmingen, Kalifornien, USA) wurden die toten Zellen identifiziert (die Ergebnisse hierzu sind im Appendix aufgeführt). Als Isotopenkontrollen wurden FITC- oder PE-konjugierte Mausantikörper (IgG_{1,k}) eingesetzt (Becton Dickinson Pharmingen). Die Messung wurde an einem FACScan (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung von jeweils 10.000 Ereignissen erfolgte mit dem im Internet frei erhältlichen Programm WinMDI von Joseph Trotter in der Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). Die Streulichtdaten wurden in linearer und die Fluoreszenzdaten in logarithmischer Skalierung dargestellt. Die graphische Auswertung einzelner Parameter erfolgte in Form von Histogrammen und die Auswertung von zwei Parametern in x-y-Diagrammen.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die antigenspezifische Restimulation alloreaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten im T-Zell-Proliferationsassay untersucht. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass die aktivierten, antigenspezifischen T-Lymphozyten mit „ihrem“ Antigen *in vitro* ein weiteres Mal in Kontakt kommen und hierdurch reaktiviert werden. Als Maß für diese Proliferation wurde der Anteil des während der Zellteilung in die sich verdoppelnde DNA eingebauten tritiummarkierten Thymidins bestimmt. Die Experimente wurden in An- und Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen durchgeführt. Als Modellantigen wurde das synthetische allogene Peptid P1 verwendet, das in Lewis-Ratten eine starke Immunantwort induziert (Sitaru AG et al., 2004). Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob aktivierte P1-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren.

4.1 T-Zell-Restimulierung in Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen

Antigenpräsentierende Zellen exprimieren unter anderem MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Oberfläche, die auch von außen mit Peptidantigenen, wie dem Modellantigen P1, beladen werden können.

4.1.1 Charakterisierung der alloantigeninduzierten T-Zell-Proliferation

Um antigenspezifische T-Lymphozyten zu erhalten, wurden Lewis-Ratten mit dem Peptidantigen P1 subkutan immunisiert. Nach 7 Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen und die Lymphknotenzellen isoliert. Auffällig war die Größenzunahme der Lymphknoten von etwa 1-2 mm bei nicht immunisierten Lewis-Ratten auf ca. 6-8 mm nach Immunisierung mit P1. Diese Größenzunahme äußerte sich auch in einer Zunahme der Zellzahl: Während

4 Ergebnisse

aus den poplitealen Lymphknoten nicht-immunisierter Lewis-Ratten durchschnittlich $2,3 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$ Lymphozyten (n=4) isoliert wurden, vervielfachte sich die Zellmenge nach Immunisierung mit P1 auf nahezu $8,9 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$ Zellen (n=23).

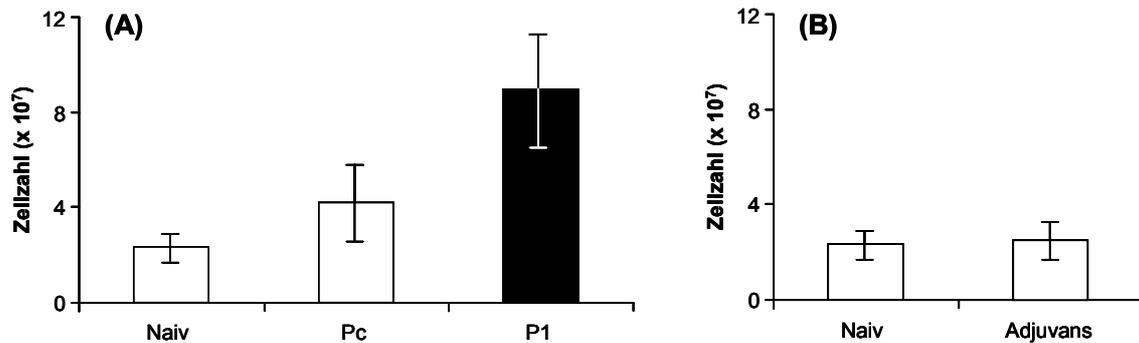


Abb. 4.1: (A) Vergleich der Zellzahlen poplitealer Lymphknoten vor (naiv) bzw. 7 Tage nach subkutaner Immunisierung mit dem syngenem Kontrollpeptid Pc und dem Alloantigen P1. Die Immunisierung mit P1 führte zu einem starken Anstieg der Lymphknotenzellen. (B) Das für eine erfolgreiche Immunisierung notwendige Adjuvans (siehe Text) hatte alleine keinen Einfluss auf die Zellzahl im Lymphknoten.

Auch die Immunisierung mit dem für T-Lymphozyten der Lewis-Ratte nicht-immunogenen Kontrollpeptid Pc erhöhte den Anteil an Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten ($4,2 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$ Zellen; n=3), doch blieb die Zellzahl hier deutlich unter der durch P1-Immunisierung induzierten Zellzahl (s. oben). Das Adjuvans TiterMax war notwendig, um eine spezifische Immunantwort gegen das Peptidantigen zu induzieren, hatte aber keinen Einfluss auf die Zellzahl im Lymphknoten ($2,5 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$ Zellen; n=3).

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Lymphknotenzellen zeigten, dass sich ihre prozentuale Zusammensetzung durch die Immunisierung mit P1 änderte (Abb. 4.2). Zwar blieb der Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten unverändert (vor Immunisierung: 23%; nach Immunisierung: 21%), doch stieg die Anzahl der B-Lymphozyten mit 28% (vor Immunisierung: 11%) um mehr als das Doppelte an. Der prozentuale Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten nahm zwar deutlich ab (vor

Immunsierung: 66% und nach Immunsierung: 51%), doch wurden durch die Immunsierung mit dem Antigen P1 antigenspezifische CD4+ T-Lymphozyten induziert (siehe unten).

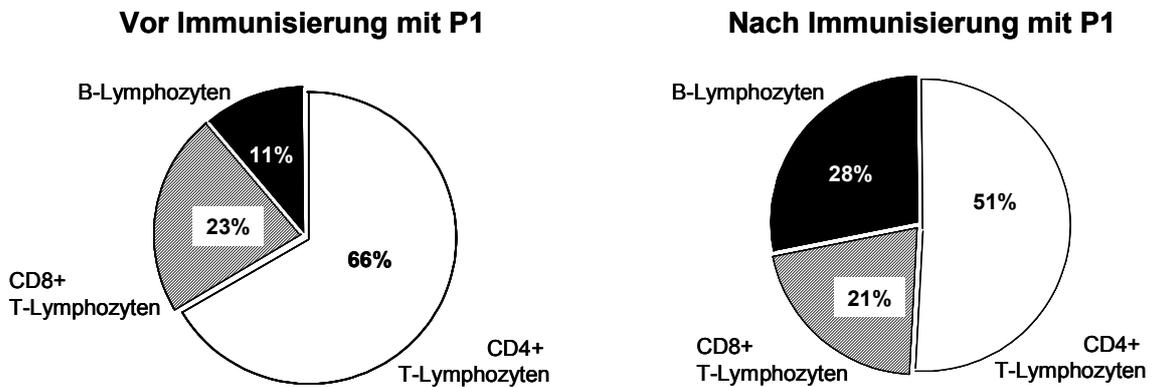


Abb. 4.2: Durchflusszytometrische Untersuchung der Lymphozytenpopulationen vor bzw. 7 Tage nach Immunsierung mit dem immunogenen Peptidantigen P1. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

Weiter wurde untersucht, ob P1-spezifische T-Lymphozyten außer in den poplitealen Lymphknoten auch in weiteren Lymphknoten zu finden sind. Hierzu wurden nach der Immunsierung mit P1 nicht nur die Lymphknotenzellen der poplitealen Lymphknoten im Proliferationsassay (siehe hierzu Kapitel 4.1.2) untersucht, sondern auch die Zellen der parailiakalen, mesenterialen und

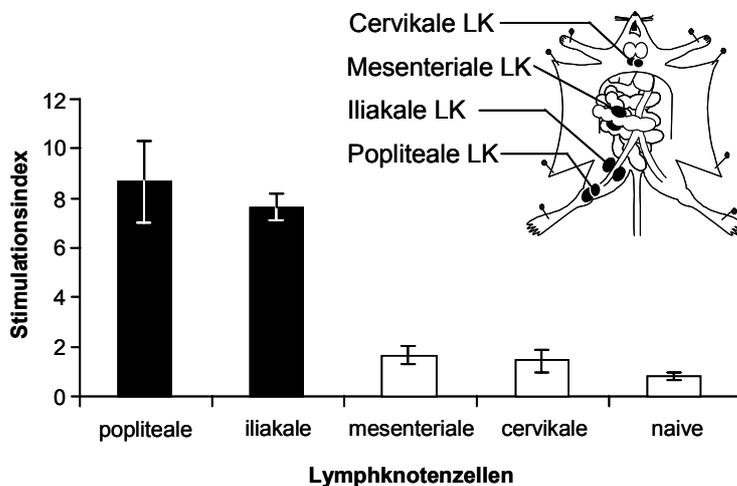


Abb 4.3: Nach subkutaner Immunsierung mit P1 ließ sich im Proliferationsassay die Verteilung der P1-spezifischen T-Zellen in den verschiedenen Lymphknotenstationen nachweisen. P1-spezifische T-Zellen waren nur in den poplitealen und parailiakalen Lymphknoten (LK) zu finden.

cervikalen Lymphknoten. Diese Zellen wurden *in vitro* mit P1 inkubiert und die Proliferationsstärke bestimmt (Abb. 4.3). Als Kontrolle dienten naive Lymphknotenzellen, d.h. Zellen aus einem nicht immunisierten Lewis-Tier.

Die Auswertung des Proliferationsassays ergab folgendes Bild von der Präsenz alloreaktiver P1-spezifischer T-Lymphozyten: In den poplitealen Lymphknotenzellen wurde, wie erwartet, die stärkste antigenspezifische T-Zell-Proliferation mit einem durchschnittlichen Stimulationsindex von $8,7 \pm 1,7$ (n=23) gemessen. Ein Stimulationsindex von $7,6 \pm 0,6$ (n=4) für die iliakalen Lymphknotenzellen wies eindeutig auf die Präsenz P1-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten in diesen Lymphknoten hin. Die Indices für die mesenterialen bzw. cervikalen Lymphknotenzellen mit $1,7 \pm 0,4$ (n=3) und $1,4 \pm 0,5$ (n=3) befanden sich dagegen im Bereich naiver Lymphknotenzellen ($0,8 \pm 0,2$; n=3) und zeigten somit sehr deutlich die Abwesenheit P1-spezifischer T-Lymphozyten an.

Die Ergebnisse belegen somit, dass die poplitealen und iliakalen Lymphknoten, die den Applikationsbereich drainieren, P1-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten enthielten. Nach ihrer subkutanen Applikation erreichte die Peptid-Adjuvans-Emulsion über die afferenten Lymphbahnen die regionalen Lymphknoten und löste eine Immunantwort aus. In den mesenterialen und cervikalen Lymphknoten waren hingegen aufgrund einer fehlenden antigenspezifischen Proliferation keine P1-spezifischen T-Lymphozyten nachzuweisen (Abb. 4.3). Somit war die nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 induzierte Immunantwort, zumindest 7 Tage nach Antigenapplikation, lokal auf die poplitealen und iliakalen Lymphknoten begrenzt.

Die Zunahme der Zellgröße und die Expression des Interleukin-2-Rezeptors sind zwei charakteristische Parameter für stimulierte T-Lymphozyten. Weniger als 5% der poplitealen Lymphknotenzellen waren nach der Immunisierung P1-spezifische T-Lymphozyten. Ihr eindeutiger Nachweis im T-Zell-Proliferationsassays unterstreicht die Sensitivität dieses Assays. Abbildung 4.4 zeigt den

Anteil aktivierter T-Lymphozyten unter unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen.

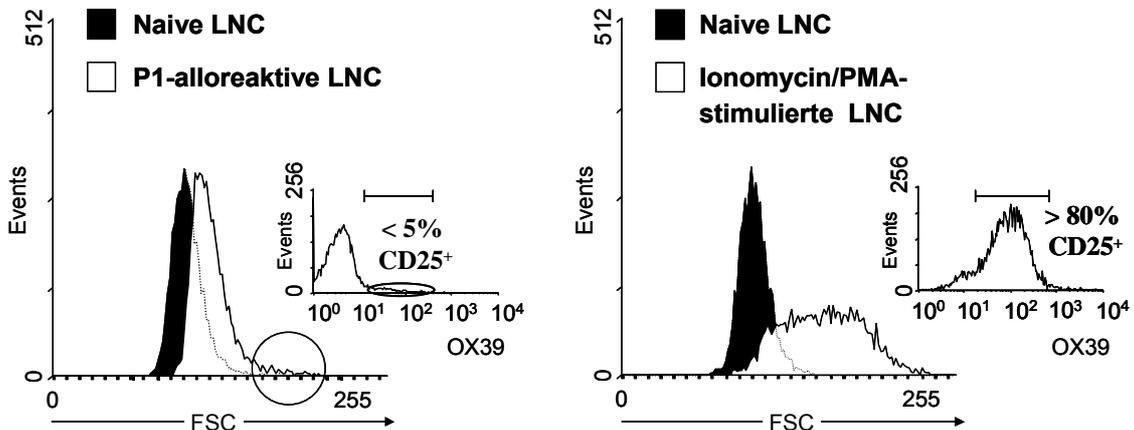


Abbildung 4.4: Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1, der Anteil P1-spezifischer T-Lymphozyten unter 5% lag. Diese sind über die Größenzunahme (Kreis im FSC-Diagramm) und Expression des IL-2-Rezeptors (Kreis im kleinen Bild) zu identifizieren. Doch nicht alle IL-2-Rezeptorpositiven Zellen werden auch antigenspezifische Zellen sein (Stichwort: CD25+ Regulatorzellen). Zum Vergleich: Ionomycin/PMA-stimulierte T-Lymphozyten (Kapitel 3.7) zeigen eine deutliche Größenzunahme und eine starke IL-2-Expression. Repräsentative Darstellung von drei Isolierungen.

Der T-Zell-Proliferationsassay erlaubt die Detektion antigenspezifischer CD4+ T-Lymphozyten *in vitro*, wenn diese Zellen „ihr“ Antigen ein weiteres Mal präsentiert bekommen (weitere Daten hierzu im Kapitel 4.1.2). In Abb. 4.5 ist diese Antigen-spezifität am Beispiel P1-spezifischer CD4+ T-Lymphozyten gezeigt, die entweder mit P1 oder dem Kontrollpeptid P6 (Abb. 3.1) inkubiert wurden. Die durch Immunisierung mit P1-aktivierten T-Lymphozyten proliferierten ausschließlich in Gegenwart von P1. Andere Peptidantigene mit vergleichbarer Länge sind zum Nachweis P1-spezifischer Zellen ungeeignet, wie am Beispiel von Peptid P6 gezeigt (Werte im Appendix). Umgekehrt können Pc-

oder P6-spezifische T-Lymphozyten durch das Peptidantigen P1 nicht restimuliert werden (nicht gezeigt).

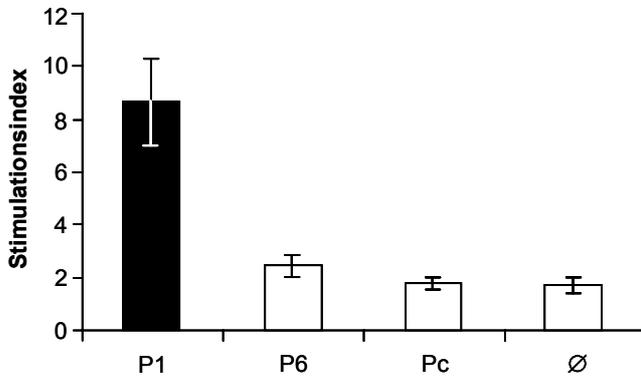


Abbildung 4.5: T-Zell-Proliferation P1-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*: Die durch Immunisierung mit P1-aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten ließen sich nur in Anwesenheit von P1 *in vitro* restimulieren. Andere Peptidantigene wie P6 wurden nicht als Antigen erkannt. Pc = Kontrollpeptid; Ø = kein Peptid.

4.1.2 Der T-Zellproliferationsassay: Analyse sensitivitätsbestimmender Parameter

Im letzten Kapitel wurden einige Charakteristika der durch Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 induzierten T-Zellproliferation aufgezeigt. Da ein Großteil der Ergebnisse in dieser Arbeit mit dem T-Zell-Proliferationsassay erhoben wurden, werden in diesem Kapitel einige Besonderheiten wie Spezifität und Sensitivität der antigenspezifischen Restimulation im Proliferationsassay überprüft, um sie gegebenenfalls zu optimieren. Dabei wurde stets ein Parameter verändert, während die anderen konstant blieben. Folgende Faktoren wurden untersucht:

- Anzahl poplitealer Lymphknotenzellen
- Anzahl dendritischer Zellen
- Peptidmenge
- Inkubationszeit

Außerdem wurde der Einfluss der für die Immunisierung eingesetzten Peptidmenge auf die Frequenz der P1-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten

untersucht. Hierzu wurden Lewis-Ratten mit 100 µg P1 (Standard) bzw. mit 50 µg P1 immunisiert und die Anzahl der aus den poplitealen Lymphknoten isolierten Lymphknotenzellen bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl mit 100 µg Peptid betrug $8,9 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$ Zellen (n=23) und mit 50 µg $5,2 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ Zellen (n=8). Auch der Proliferationsindex sank von $8,7 \pm 1,7$ (n=23) für 100 µg Peptid auf $7,7 \pm 1,2$ (n=6) für 50 µg Peptid. Der Proliferationsassay wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen (routinemäßig wurden 1×10^5 Lymphknotenzellen und 1×10^4 dendritische Zellen eingesetzt) jeweils in 150 µl einer Zellkultur-Mikroplatte mit 96 Vertiefungen für 3 Tage inkubiert.

Die Anzahl poplitealer Lymphknotenzellen (Abb. 4.6): Hierzu wurde die Anzahl an poplitealen Lymphknotenzellen zwischen 1×10^3 und 1×10^7 Zellen variiert (Abb. 4.6). Sowohl für 1×10^3 als auch 1×10^4 Lymphknotenzellen, dies entspricht weniger als 50 bzw. 500 antigenspezifischen T-Lymphozyten, wenn von einer Frequenz von 5% P1-spezifischer Zellen ausgegangen wird (wie der Abbildung 4.4 in Kapitel 4.1.1 zu entnehmen ist), wurde keine bzw. eine sehr

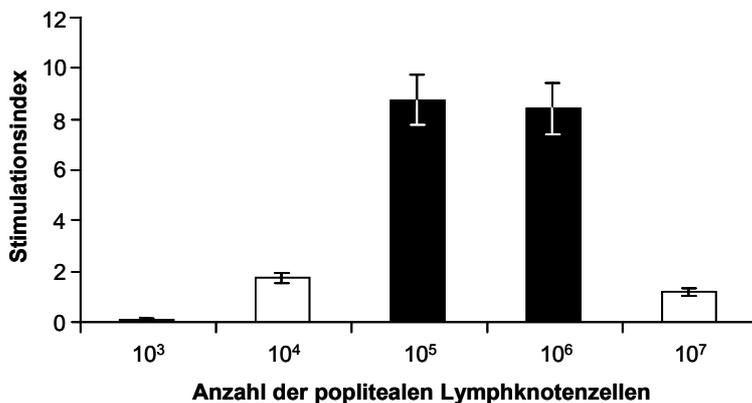


Abb. 4.6: Der Einfluss unterschiedlicher Anteile an Lymphknotenzellen auf die T-Zellproliferation. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils drei Versuche angegeben.

geringe Proliferation nachgewiesen. Der Stimmulationsindex (SI) betrug $0,1 \pm 0,1$ für 1×10^3 bzw. $1,7 \pm 0,2$ für 1×10^4 Zellen (naive Lymphknotenzellen: $0,8 \pm 0,2$). Im Bereich zwischen 1×10^5 (SI: $8,7 \pm 0,98$) und 1×10^6 (SI: $8,4 \pm 1,0$) Lymphknotenzellen (entsprechend 5.000 bzw. 50.000 aktivierten T-Lympho-

zyten) wurde die optimale Zellzahl gefunden, während für 1×10^7 Lymphknotenzellen die vorgegebenen Kultivierungsbedingungen (siehe auch Kapitel 3.5) suboptimal waren (Stichwort Nährstoffmangel). Der Stimulationsindex betrug hier $1,2 \pm 0,2$.

Die Anzahl dendritischer Zellen (Abb. 4.7): Die Anzahl der dendritischen Zellen wurde zwischen 10^2 und 10^5 Zellen pro Ansatz eingestellt. Das Maximum der T-Zellproliferation lag mit einem Stimulationsindex von $8,7 \pm 1,7$ bei 1×10^4 dendritischen Zellen ($n=23$). Dies entsprach einem Verhältnis von einer dendritischen Zelle zu 10 Lymphknotenzellen. Die Stimulationsindices für die anderen Versuchsansätze waren: $5,2 \pm 0,9$ für 1×10^2 Zellen, $5,5 \pm 0,9$ für 1×10^3 Zellen und $4,9 \pm 1,2$ für 1×10^5 Zellen. Der Effekt der Nullkontrolle (keine Zugabe von dendritischen Zellen) auf die Proliferation P1-spezifischer T-Lymphozyten ($4,7 \pm 0,7$) wird im Kapitel 4.2 näher behandelt.

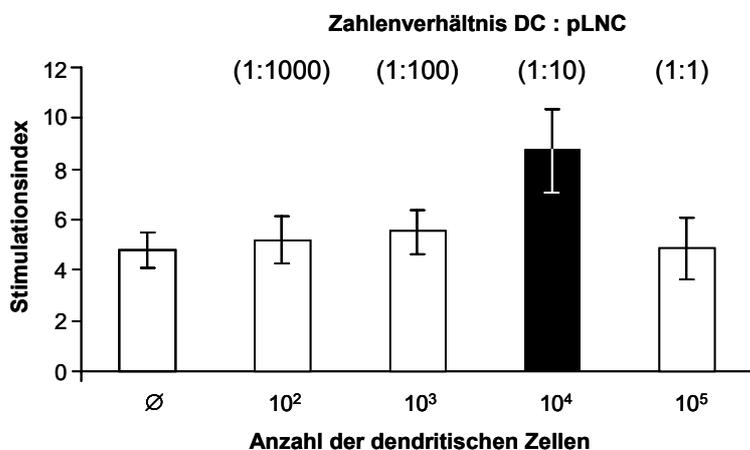


Abbildung 4.7: Der Einfluss unterschiedlicher Anteile an dendritischen Zellen (DC) auf die Proliferation von Lymphknotenzellen (pLNC). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils drei Versuche angegeben. Ø = keine DC.

Die Peptidmenge (Abb. 4.8): Als nächstes wurde der Einfluss unterschiedlicher Peptidmengen auf die Restimulation geprüft. Die Werte für $8,3 \mu\text{g/ml}$ P1 (entspricht $1,25 \mu\text{g}$ pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen) waren genauso hoch wie der Standard mit $33,3 \mu\text{g/ml}$ P1 (entspricht $5 \mu\text{g}$ pro Vertiefung). Bei niedrigeren Peptidkonzentrationen verringerte sich auch die Proliferation. Ab $0,03 \mu\text{g/ml}$ war keine Proliferation mehr zu messen gewesen (Werte s. Appendix).

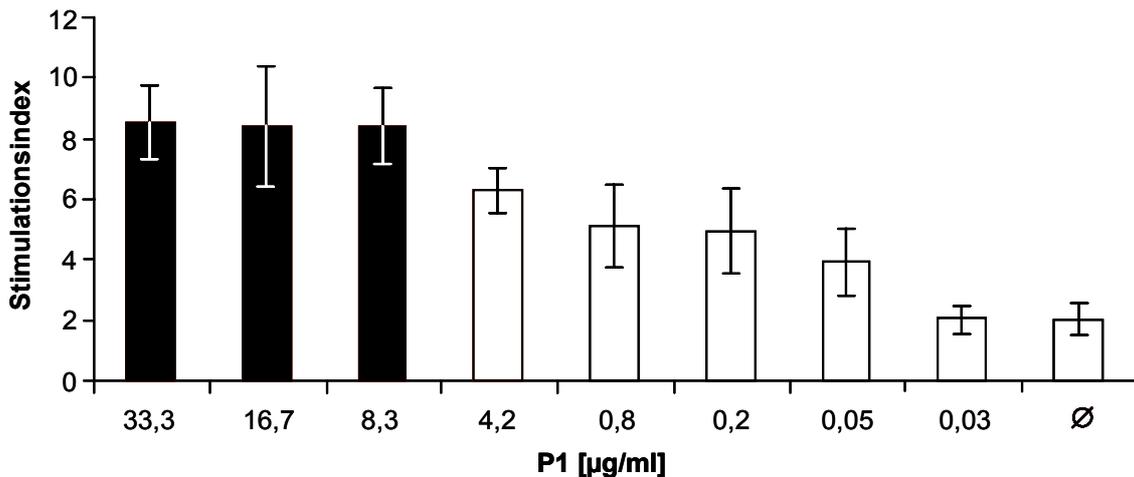


Abb. 4.8: Der Einfluss der Antigenkonzentration auf die Stärke der Restimulation im T-Zell-Proliferationsassay. In einem Konzentrationsbereich zwischen 33,33 und 8,33 µg/ml war die T-Zell-Proliferation gleich stark. Die Anzahl der Versuchswiederholungen variierte zwischen 1 und 8 (s. hierzu Appendix). Ø = Abwesenheit von P1.

Die Inkubationszeit (Abb. 4.9): In einer weiteren experimentellen Serie wurde der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Proliferationsstärke untersucht. Dazu wurde ein Zeitraum von 24 bis 120 Stunden überprüft. Wie erwartet, konnte eine maximale Proliferation bestimmt werden; dabei lag das Optimum mit einem Simulationsindex von $8,6 \pm 0,5$ ($n=4$) bei 72 Stunden. Die Indices für die anderen Zeitpunkte waren: nach 24 Stunden $0,7 \pm 0,1$ ($n=2$), nach 48 Stunden $2,7 \pm 0,5$ ($n=2$), nach 96 Stunden $7,6 \pm 1,2$ ($n=4$) und nach 120 Stunden $5,0 \pm$

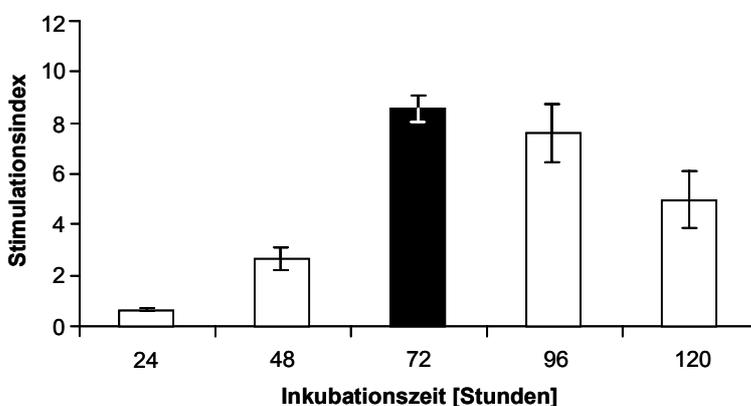


Abbildung 4.9: Der Einfluss der Inkubationsdauer auf die Restimulation antigenspezifischer T-Lymphozyten im T-Zell-Proliferationsassay.

1,1 (n=2).

Die Überprüfung dieser Parameter führte dazu, dass die für den Proliferationsansatz notwendige Peptidkonzentration von 33,33 $\mu\text{l/ml}$ auf 8,33 $\mu\text{l/ml}$ reduziert wurde (Abb. 4.8). Die anderen Parameter wurden nicht verändert, da sie bereits optimal eingestellt waren.

4.1.3 Bedeutung MHC-Klasse-II-exprimierender Zellen für die T-Zell-Restimulierung

Dendritische Zellen exprimieren konstitutiv MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 4.10 A) sowie die zur Kostimulation notwendigen Moleküle (nicht gezeigt). Auch B-Lymphozyten exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, wenn auch nicht so stark wie dendritische Zellen (Abb. 4.10 B). Deshalb wurden sie im T-Zell-Proliferationsassay auf ihre Fähigkeit überprüft, die Restimulation zu ermöglichen.

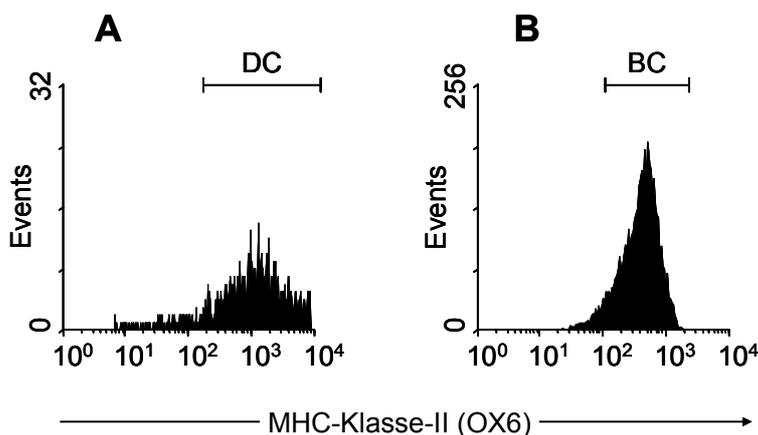


Abbildung 4.10: Durchflusszytometrische Untersuchung der MHC-Klasse-II-Expression auf angereicherten (A) dendritischen Zellen (DC) und (B) B-Lymphozyten (BC). Beide Populationen wurden aus der Milz isoliert. Repräsentative Darstellung von jeweils drei Isolierungen.

4 Ergebnisse

Hierzu wurden B-Lymphozyten der Milz mit dem B-Zell-spezifischen Antikörper OX33 und magnetischen Partikeln, sog. Dynalbeads, aufgereinigt (s. Kapitel 3.5.3). Aus 1×10^8 Milzzellen wurden durchschnittlich $1,3 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^6$ ($n=6$) hochreine B-Lymphozyten gewonnen (Abb. 4.11).

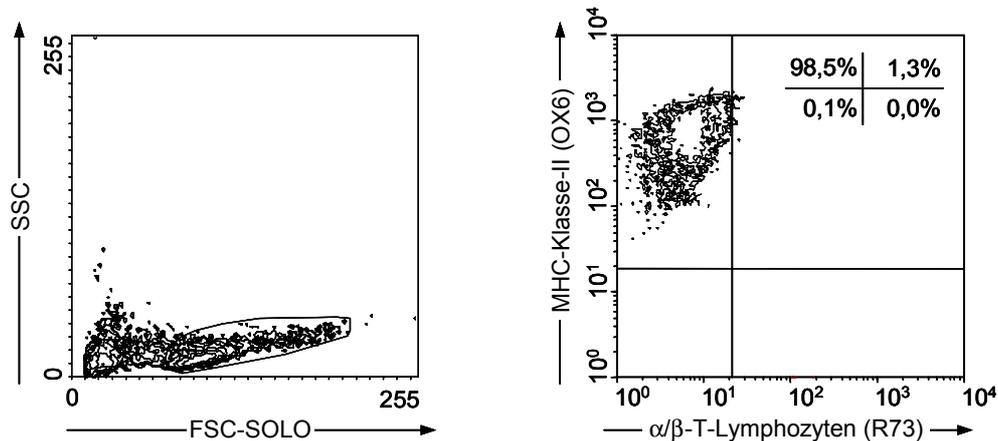


Abb. 4.11: Durchflusszytometrische Analyse aufgereinigter B-Lymphozyten der Milz. Die Reinheit dieser Zellen lag über 98%. Repräsentative Darstellung aus vier Isolierungen.

Die Zahl der B-Lymphozyten wurde im Proliferationsassay zwischen 1×10^2 und 1×10^5 Zellen variiert (Abb. 4.12). Mit 1×10^2 B-Lymphozyten wurde ein Proliferationsindex von $6,1 \pm 0,9$ ($n=3$) erzielt und mit 1×10^3 B-Lymphozyten das Maximum von $6,6 \pm 1,1$ ($n=6$) erreicht. Bei größeren Zellzahlen nahm die Prolif-

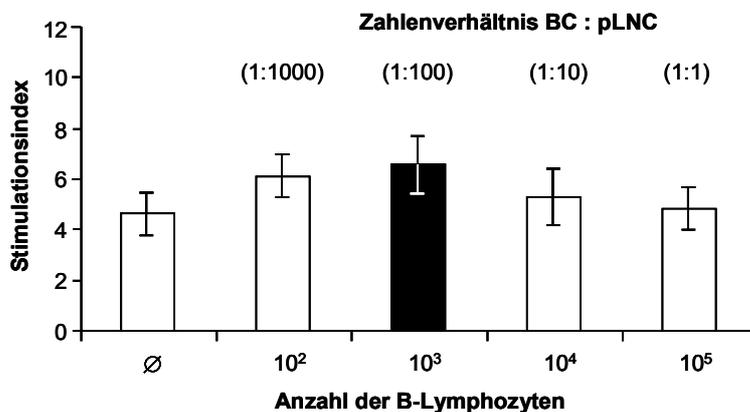


Abb. 4.12: Der Einfluss unterschiedlicher Anteile aufgereinigter B-Lymphozyten (BC) auf die Proliferation poplitealer Lymphknotenzellen (pLNC). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung für jeweils drei Versuche angegeben. ∅ = keine BC.

feration wieder ab: für 1×10^4 Zellen $5,3 \pm 1,1$ ($n=6$), für 1×10^5 Zellen $4,8 \pm 0,8$ ($n=3$). Der Durchschnittswert der Kontrolle ohne antigenpräsentierende Zellen lag bei $4,6 \pm 0,8$ ($n=25$). Diese Ergebnisse zeigen, dass aufgereinigte B-Lymphozyten aus der Milz als antigenpräsentierende Zellen für den T-Zell-Proliferationsassay nicht geeignet sind (Abb. 4.12). Dagegen waren aktivierte B-Lymphozyten hierzu sehr wohl in der Lage (Abb. 4.13). Bereits mit 1×10^3 aktivierten B-Lymphozyten war die induzierte T-Zellproliferation mit einem SI von $9,5 \pm 2,7$ ($n=3$) deutlich stärker als mit 1×10^4 dendritischen Zellen ($8,7 \pm 1,7$; $n=23$). Mit steigendem Anteil an aktivierten B-Lymphozyten stieg auch die Proliferation. So wurden mit 10^4 B-Lymphozyten ein Index von $14,2 \pm 3,1$ ($n=3$) und mit 10^5 B-Lymphozyten sogar ein Index von $23,0 \pm 4,1$ ($n=3$) erreicht. Prinzipiell ist es somit möglich, B-Lymphozyten als antigenpräsentierende Zellen im Proliferationsassay einzusetzen.

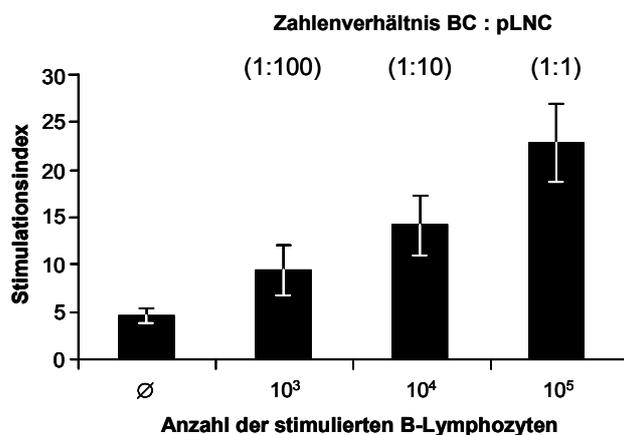


Abb. 4.13: Der Einfluss Ionomycin /PMA-stimulierter B-Lymphozyten auf die Restimulation P1-spezifischer T-Lymphozyten im T-Zell-Proliferationsassay. Solche Zellen induzierten nach ihrer Beladung mit dem Antigen P1 eine sehr starke Restimulation. ∅ = keine BC.

Zusammenfassung von Kapitel 4.1: Die subkutane Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 führte zu einer lokal begrenzten Immunantwort in den poplitealen und iliakalen Lymphknoten (Abb. 4.3) mit deutlicher Größenzunahme der poplitealen Lymphknoten und einem Zuwachs der Lymphknoten-

zellen auf das Vierfache (Abb. 4.1 A). Dabei veränderte sich die Verteilung der Populationen im Lymphknoten (Abb. 4.2). Auffällig war vor allem die Verdopplung des B-Lymphozyten-Anteils. Dennoch wurden mit der Immunisierung zweifelsfrei P1-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten induziert. Anteilmäßig machten diese Zellen weniger als 5% der poplitealen Lymphknotenzellen aus (Abb. 4.4). Der eindeutige Nachweis dieser wenigen P1-spezifischen T-Lymphozyten im Proliferationsassay unterstreicht die Sensitivität dieses Assays. Die Spezifität des T-Zell-Proliferationsassays wurde dadurch gezeigt, dass peptidspezifische T-Lymphozyten ausschließlich in Anwesenheit des Peptidantigens proliferierten, mit dem die Lewis-Ratte zuvor immunisiert wurde (Abb. 4.5). Im Rahmen der Analyse der sensitivitätsbestimmenden Parameter des T-Zell-Proliferationsassays wurde der Anteil poplitealer Lymphknotenzellen (pLNC) und dendritischer Zellen, die Peptidmenge sowie die Inkubationszeit variiert. Optimale Proliferationswerte wurden mit 10^5 bis 10^6 pLNC (Abb. 4.6), 10^4 dendritische Zellen (Abb. 4.7), einer Peptidmenge von wenigstens 8,3 µg/ml (Abb. 4.8) und einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (Abb. 4.9) erzielt. Außerdem wurden nicht aktivierte B-Lymphozyten aus der Milz auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation untersucht, da sie wie dendritische Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 4.10/11). Im Gegensatz zu dendritischen Zellen waren B-Lymphozyten als antigenpräsentierende Zellen nicht geeignet (Abb. 4.12). Erst nach ihrer Stimulation mit Ionomycin und PMA induzierten die B-Lymphozyten eine sehr starke Restimulation im T-Zell-Proliferationsassay (Abb. 4.13).

4.2 T-Zell-Restimulation in Abwesenheit *antigenpräsentierender* Zellen

Für die *in vitro* Restimulation alloreaktiver, P1-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten sind antigenpräsentierende Zellen notwendig, um das Peptidantigen P1 in den MHC-Klasse-II-Molekülen zu präsentieren und um die Kostimulation zu gewährleisten (z.B. Abb. 4.7). Andererseits war, wie bereits in Abb. 4.12 gezeigt, eine Restimulation P1-alloreaktiver T-Lymphozyten durch alleinige Antigenzugabe auch ohne die Präsenz antigenpräsentierender Zellen möglich. Der Stimulationsindex lag dabei signifikant über dem naiver T-Lymphozyten ($4,6 \pm 0,8$; $n=25$ vs. $0,8 \pm 0,2$; $n=3$). Die Stärke dieser Autostimulation machte dabei ungefähr 50% der durch dendritische Zellen vermittelten Proliferation aus (Abb. 4.14).

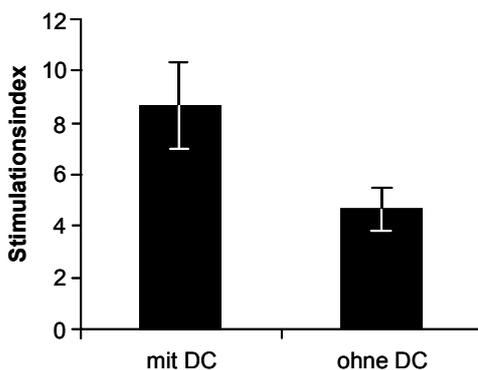


Abb. 4.14: T-Zell-Proliferation bei An- bzw. Abwesenheit dendritischer Zellen (DC). Die Proliferation ohne die Präsenz antigenpräsentierender Zellen betrug ca. 50% der DC-vermittelten Proliferation. Diese durch T-Lymphozyten vermittelte Restimulation wird als Autostimulation bezeichnet.

Autostimulation ließ sich nicht nur für P1-spezifische T-Lymphozyten nachweisen. Auch andere antigenspezifische T-Lymphozyten proliferierten durch Autostimulation, wenn sie im Proliferationsassay mit „ihrem“ Peptidantigen restimuliert wurden. So wurde ebenfalls mit dem allogenen MHC-Klasse-II-Peptid RT1.D2 (Sayegh MH et al., 1992; Otto C et al., 2002) eine solche Autostimulation beobachtet (Abb. 4.15; SI: $6,6 \pm 0,7$; $n=3$).

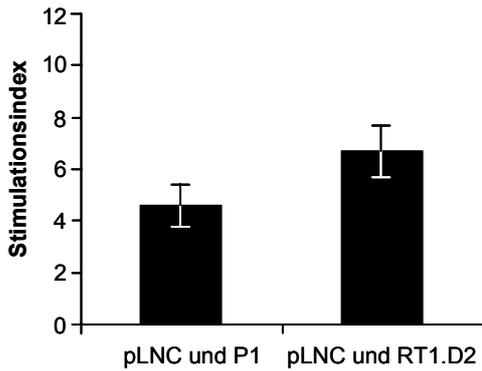


Abb. 4.15: Die Autostimulation ließ sich nicht nur für P1-spezifische T-Lymphozyten nachweisen. Auch RT1.D2-spezifische T-Lymphozyten proliferierten durch Autostimulation, wenn sie im Proliferationsassay mit „ihrem“ Peptidantigen, in diesem Fall das RT1.D2-Peptid, restimuliert wurden.

4.2.1 Nachweis der MHC-Klasse-II-Expression auf aktivierten T-Lymphozyten

In weiteren Experimenten galt es nun zu überprüfen, ob diese Proliferation wirklich auf Autostimulation aktivierter CD4+ T-Lymphozyten zurückzuführen war, oder ob andere Lymphknotenzellen, wie B-Lymphozyten, aufgrund ihrer Fähigkeit MHC-Klasse-II-Moleküle zu exprimieren (Abb. 4.11), hierzu in der Lage waren. Die Abbildung 4.16 zeigt, dass in den Lymphknoten P1-immunisierte Tiere vor allem B-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierten (OX6^{pos}).

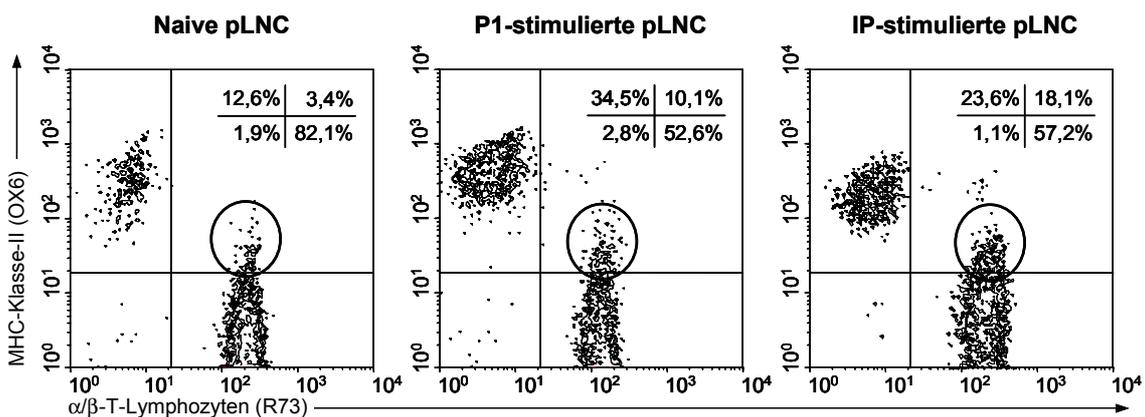


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Analyse der MHC-Klasse-II-Expression durch popliteale Lymphknotenzellen (pLNC). Ein Teil der R73+ T-Lymphozyten exprimierte MHC-Klasse-II-Moleküle (Kreise). Nach Stimulierung mit P1 oder mit Ionomycin/PMA (IP) stieg der Anteil der OX6^{pos} T-Lymphozyten an. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

Auch ein Teil der R73+ T-Lymphozyten war OX6^{pos}. So exprimierten 3,4% der naiven und 10% der P1-aktivierten T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-Moleküle (Abb. 4.16). Wurden naive Lymphknotenzellen für 72 Stunden mit Ionomycin und PMA stimuliert, so waren sogar 18% der R73+ T-Lymphozyten OX6^{pos}.

4.2.2 MHC-Klasse-II-positive CD4+ T-Lymphozyten als Ursache der Autostimulation

Um auszuschließen, dass die B-Lymphozyten für die Aktivierung der P1-alloreaktiven T-Lymphozyten verantwortlich sind, wurden diese mit dem Antikörper OX33 und magnetischen Beads (Dynalbeads) aus der Lymphozytenpopulation depletiert. Hierdurch wurde ihr Anteil auf ca. 1,3% reduziert (Abb. 4.17). Die verbliebene Zellpopulation (hierbei handelte es sich vor allem um CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten) wurde im Proliferationsassay restimuliert. Wie Abb. 4.17 zeigt, proliferierten die alloreaktiven CD4+ T-Lymphozyten in diesem Zellgemisch in Gegenwart von P1 auch weiterhin (SI: $5,7 \pm 1,4$; n=5).

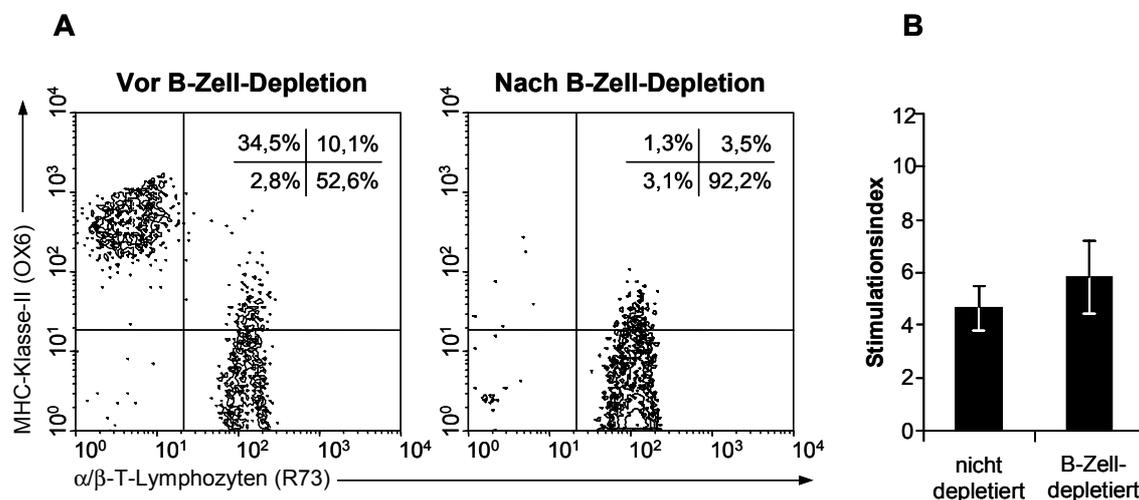


Abbildung 4.17: (A) Durchflusszytometrische Analyse P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen vor und nach der B-Lymphozyten-Depletion mit OX33. (B) Im T-Zell-Proliferationsassay war die Proliferation in Abwesenheit von B-Lymphozyten unverändert hoch. Somit scheinen B-Lymphozyten nicht an der Präsentation von P1 beteiligt zu sein. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

4 Ergebnisse

Aus diesem Grund wurden neben den B-Lymphozyten auch die CD8+ T-Lymphozyten depletiert (Abb. 4.18). Hierzu wurden die beiden Antikörper OX33 (anti-CD45RA) und OX8 (anti-CD8 α) verwendet. Wie bereits für die B-Lymphozyten gezeigt, war diese Methode auch bei der Depletion der CD8+ T-Lymphozyten von über 20% auf 3,1% sehr effektiv. Anschließend wurden die OX33- und OX8-negativen Zellen im Proliferationsassay mit dem Peptid P1 restimuliert. Auch jetzt blieb der Stimulationsindex mit $5,9 \pm 0,8$ (n=3) unverändert hoch.

Die Ergebnisse beider Experimente legen somit nahe, dass weder B-Lymphozyten noch CD8+ T-Lymphozyten an der Präsentation von P1 beteiligt waren, da ihre Abwesenheit nicht die Stärke der induzierten Proliferation P1-alloreaktiver CD4+ T-Lymphozyten im Proliferationsassay beeinflusste.

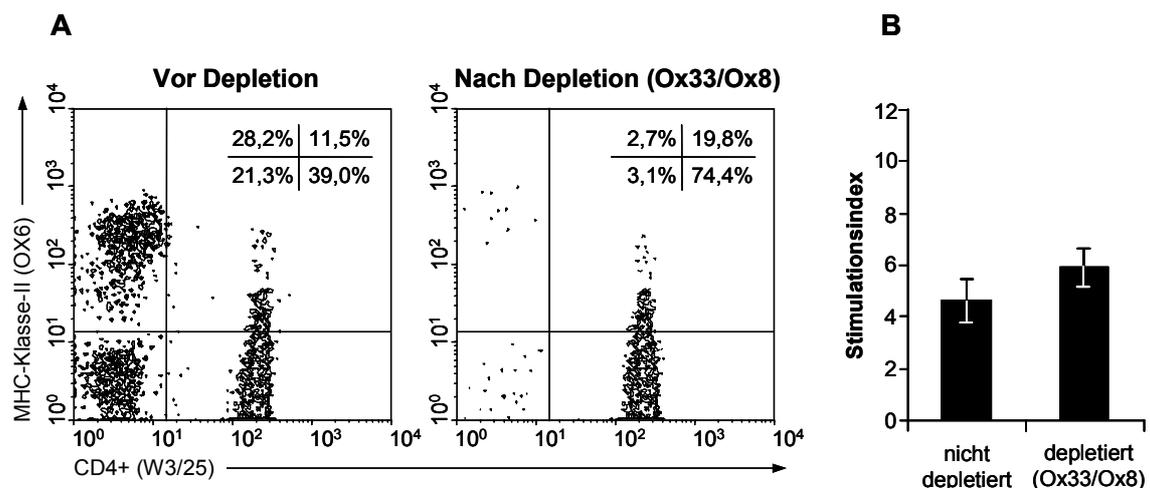


Abbildung 4.18: (A) Durchflusszytometrische Analyse P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen vor und nach der Depletion von B-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozyten. (B) Im T-Zell-Proliferationsassay war die Proliferation in Abwesenheit der OX33- und OX8-positiven Zellen unverändert hoch. CD8+ T-Lymphozyten waren somit ebenfalls nicht an der Präsentation von P1 beteiligt (s. auch Abb. 4.17). Repräsentative Darstellung aus vier Versuchen.

4 Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden diese Ergebnisse überprüft, indem die T-Lymphozyten positiv selektiert wurden (Kapitel 3.7.3). Hierfür wurde der Antikörper R73 (Hünig T et al., 1989), der an den α/β -T-Zell-Rezeptor bindet, verwendet. Durch die Positivselektion mit R73 wurden auch die CD8⁺ T-Lymphozyten angereichert, diese sind aber - wie bereits gezeigt - nicht an der Antigenpräsentation beteiligt (siehe oben). Nach der Aufreinigung mit R73 waren die B-Lymphozyten nahezu vollständig entfernt (Abb. 4.19). Der Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten lag bei 17,2% und der Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten bei 82,1%. Diese angereicherten T-Lymphozyten wurden im Proliferationsassay mit dem Peptid P1 restimuliert. Wie erwartet, proliferierten sie ohne Zugabe von antigenpräsentierenden Zellen.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass aktivierte, P1-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten P1 binden können und somit zur Autostimulation fähig sind.

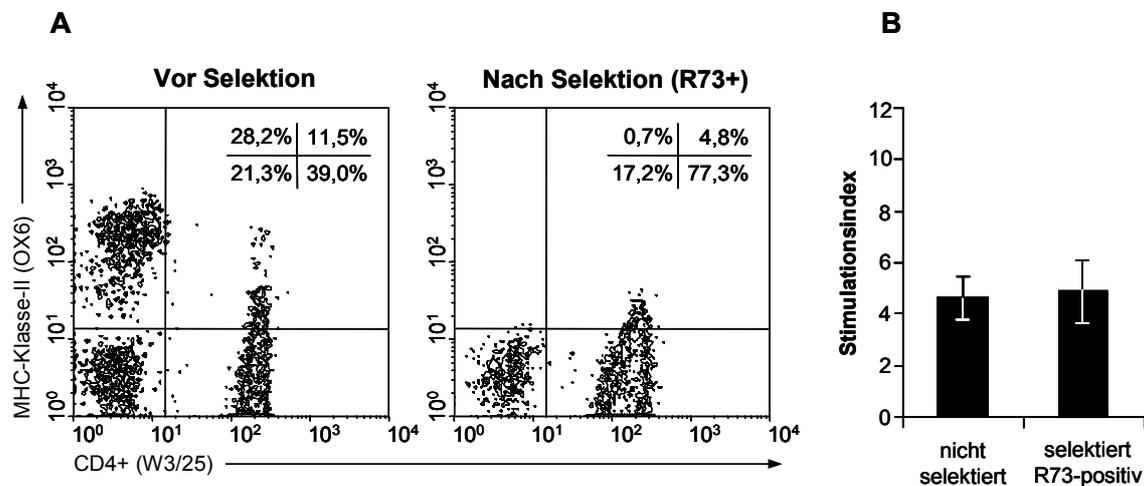


Abbildung 4.19: (A) Durchflusszytometrische Analyse P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen vor und nach Positiv-Selektion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem anti- α/β -TCR-Antikörper R73. (B) Im T-Zell-Proliferationsassay proliferierten auch diese aufgereinigten T-Lymphozyten in Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen nach Zugabe von P1. Da bereits die CD8⁺ T-Lymphozyten als Kandidaten zur Präsentation von P1 ausgeschlossen wurden (Abb. 4.18), müssen die CD4⁺ T-Lymphozyten für die Proliferation verantwortlich sein. Repräsentative Darstellung aus vier Versuchen.

4 Ergebnisse

Anschließend wurden aus der R73-positiven Population die MHC-Klasse-II-positiven Zellen mit dem Antikörper OX6 depletiert (Kapitel 3.7.3). Die Reinheit dieser R73-positiven, OX6-negativen Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft: Die MHC-Klasse-II-exprimierenden Zellen wurden dabei von 4,8% auf 0,3% reduziert. B-Lymphozyten, die ja ebenfalls MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, waren nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.20).

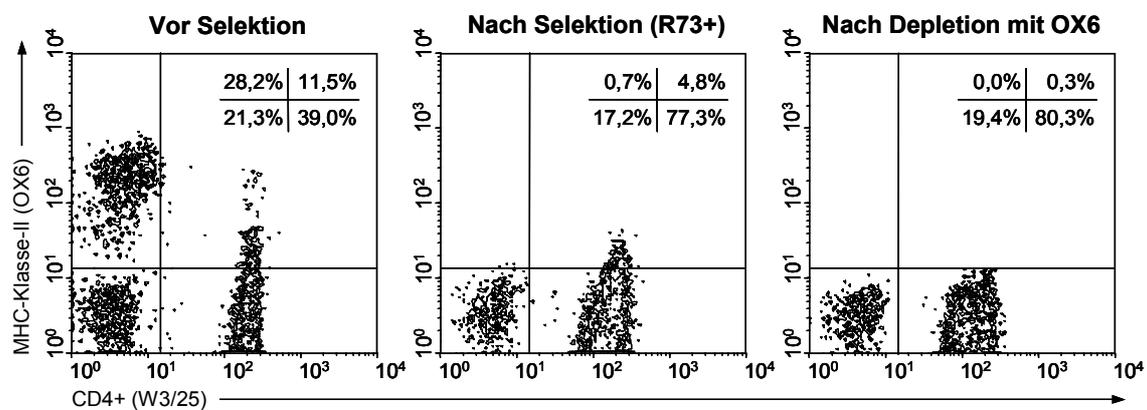


Abbildung 4.20: Durchflusszytometrische Analyse poplitealer Lymphknotenzellen: Aus den Lymphknotenzellen (links) wurden zuerst die R73-positiven Zellen positiv selektiert (mitte). Anschließend wurden die MHC-Klasse-II-positiven Zellen mit OX6 depletiert (rechts). Repräsentative Darstellung aus vier Versuchen.

Die aufgereinigten R73-positiven, OX6-negativen T-Lymphozyten wurden im Proliferationsassay mit dem Ergebnis restimuliert, dass sie nun nicht mehr in Gegenwart von P1 proliferierten ($0,4 \pm 0,10$; $n=3$). Zum Vergleich: Für die nicht-aufgereinigten Lymphknotenzellen einer P1-immunisierten Lewis-Ratte wurde eine Proliferation von $4,6 \pm 0,83$ ($n=25$) und für die OX6-positiven, R73+ T-Lymphozyten eine Proliferation von $4,9 \pm 1,20$ ($n=3$) nach Zugabe von P1 bestimmt. Diese Daten bestätigen die Bedeutung MHC-Klasse-II-positiver CD4+ T-Lymphozyten für die Autostimulation.

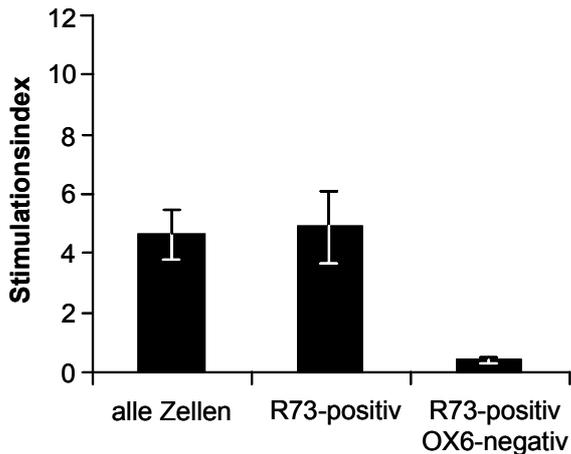


Abbildung 4.21: T-Zell-Proliferation nach Positiv-Selektion mit dem Antikörper R73 und Depletion der OX6^{pos} T-Lymphozyten (Reinheit in Abb. 4.20 dargestellt). Die MHC-Klasse-II-negativen Zellen proliferierten nicht mehr nach Zugabe von P1. Die MHC-Klasse-II-Moleküle auf den T-Lymphozyten (Abb. 4.20 u. 4.22) schienen somit das zugegebene Peptidantigen P1 den eigenen antigenspezifischen Zellen zu präsentieren (n=3).

4.2.3 Beeinflussung der Autostimulation: Blockierungsexperimente mit monoklonalen Antikörpern

Die in diesen Versuchen verwendeten Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen getestet: 50, 10, 1 und 0,1 µg/ml. Nach der Antikörperinkubation wurden die poplitealen Lymphknotenzellen zweimal gewaschen, bevor das Peptidantigen zugegeben wurde. Auf eine Aufreinigung der P1-spezifischen T-Lymphozyten aus den Lymphknotenzellen wurde verzichtet, da offensichtlich weder B-Lymphozyten noch CD8+ T-Lymphozyten an der Restimulation der P1-spezifischen T-Lymphozyten beteiligt waren (s. oben).

Zuerst wurden die MHC-Klasse-II-Moleküle aus dem RT1.B- und RT1.D-Lokus mit den Antikörpern OX6 und OX17 blockiert. Die Zugabe von OX6 zum Proliferationsansatz führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der T-Zell-Proliferation. Dabei spielte es keine Rolle, ob zuerst der Antikörper oder das Peptidantigen P1 dem Versuchsansatz zugesetzt wurde. In beiden Fällen wurde die Proliferation mit dem Antikörper OX6 blockiert. Mit 50 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml OX6 lag der Stimmulationsindex unter bzw. in der Nähe von 1,7 (Abschnitt 3.6). Dieser Wert markiert die Grenze zwischen Proliferation und Nichtproliferation. Folgende Werte wurden ermittelt: 50 µg/ml: $0,72 \pm 0,10$; 10

4 Ergebnisse

$\mu\text{g/ml}$: $1,2 \pm 0,08$; $1 \mu\text{g/ml}$: $1,8 \pm 0,19$ (jeweils $n=3$). Selbst eine Antikörperkonzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ OX6 ($3,6 \pm 0,32$; $n=3$) reichte aus, um die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ($4,5 \pm 0,8$; $n=5$) doch deutlich zu supprimieren.

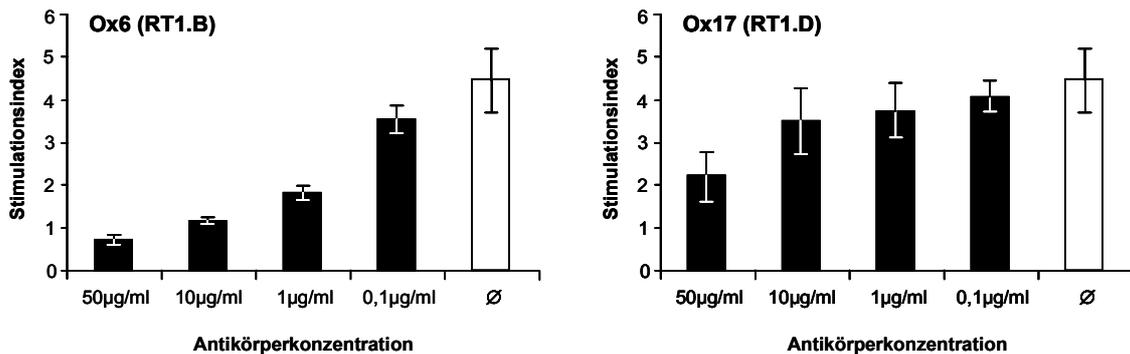


Abbildung 4.22: T-Zell-Proliferation nach Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle mit den Antikörpern OX6 (RT1.B) und OX17 (RT1.D). Die Ergebnisse zeigen, dass P1 hauptsächlich von MHC-Klasse-II-Molekülen aus dem RT1.B-Lokus präsentiert werden. Ø = kein Antikörper.

Die Zugabe des anti-RT1.D-Antikörpers OX17 hemmte wesentlich schwächer die Proliferation der alloreaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten. Nur in der höchsten Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ war eine deutliche Hemmung zu beobachten ($2,2 \pm 0,58$; $n=3$). Bereits bei $10 \mu\text{g/ml}$ näherte sich der Stimulationsindex mit $3,49 \pm 0,78$ ($n=3$) der Kontrolle ohne Antikörper ($4,6 \pm 0,8$; $n=25$) an. Mit $1 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,1 \mu\text{g/ml}$ des Antikörpers OX17 lag der Stimulationsindex (SI) bei $3,73 \pm 0,64$ bzw. $4,07 \pm 0,37$ (jeweils $n=4$). Der Vergleich der Inhibitionsversuche mit den beiden Antikörpern zeigt, dass das Peptidantigen P1 wohl in erster Linie von MHC-Klasse-II-Molekülen aus dem RT1.B-Lokus präsentiert werden, da die Blockade dieser MHC-Moleküle die T-Zell-Proliferation am stärksten beeinflusste.

Die Ergebnisse mit dem anti-MHC-Klasse-I Antikörper OX18 (Abb. 4.20) unterstreichen, dass P1 durch MHC-Klasse-II Moleküle präsentiert wird. Bis zu einer Dosierung von 50 µg/ml war keinerlei Verringerung der Proliferation zu beobachten: 10 µg/ml: $3,7 \pm 0,47$; 1 µg/ml: $4,1 \pm 1,12$; 0,1 µg/ml: $4,3 \pm 0,93$; jeweils n=4). Jedoch war bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml die Proliferation effektiv gehemmt ($1,5 \pm 0,20$; n=3). Da die Kontrolle mit Mause serum auch bei einer Konzentration von 50 µg/ml keinerlei Effekte zeigte (Abb. 4.26), erscheint es nicht gerechtfertigt, die Wirkung von OX18 bei dieser Konzentration als unspezifisch zu interpretieren. Jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt dieses Ergebnis nicht vollständig zu erklären.

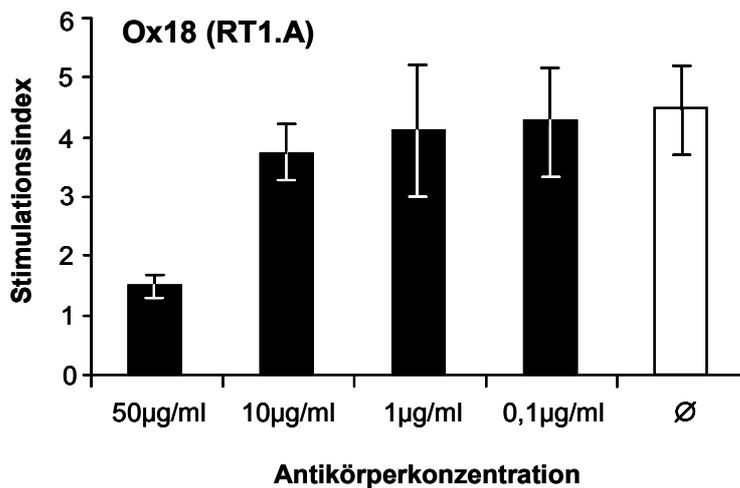


Abbildung 4.23: T-Zell-Proliferation nach Blockade des MHC-Klasse-I-Moleküls mit dem Antikörper OX18 (RT1.A). In der höchsten Antikörperkonzentration war ebenfalls eine Reduzierung der Proliferation zu beobachten. Ø = kein Antikörper.

Als nächstes wurde die α -Kette (CD25) des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R) mit dem Antikörper NDS61 blockiert (Abb. 4.24). Bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml wurde eine vollständige Inhibition der T-Zellproliferation erreicht ($0,04 \pm 0,01$; n=5). Da jedoch die Vitalität der Zellen zum Versuchsende nicht überprüft wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die kaum messbare Proliferation nicht eher ein Indiz dafür ist, dass bei dieser Antikörperkonzentration sämtliche Zellen in Apoptose überführt wurden. Niedrigere Konzentrationen dieses Antikörpers waren ebenfalls noch effektiv (10 µg/ml

NDS61: $1,9 \pm 0,23$; $n=4$) bzw. führten zu einer Verringerung der Proliferation: 1 mg/ml: $3,4 \pm 0,49$; $n=4$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$: $4,1 \pm 0,77$; $n=4$).

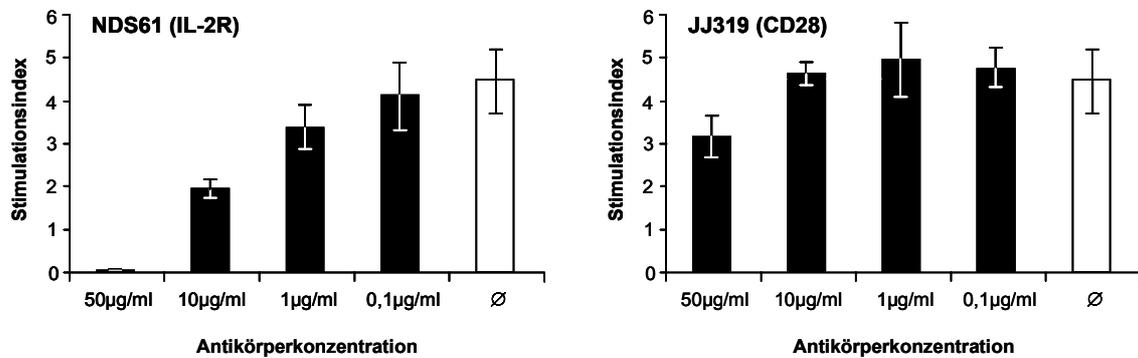


Abbildung 4.24: T-Zell-Proliferation nach Blockade kostimulatorischer Signale. Während die Blockade des Interleukin-2 Rezeptors die Restimulation sehr stark hemmte, führte die Blockade des CD28-Rezeptors zu keiner wesentlichen Reduktion der Proliferation. \emptyset = kein Antikörper (siehe auch Abb. 4.25).

Die Blockade des CD28-Rezeptors führte zu keiner wesentlichen Reduktion der Proliferation (Abb. 4.24). Für diese Versuche wurde der anti-CD28-Antikörper JJ319 verwendet. Nur in der höchsten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ war die Proliferation der poplitealen Lymphknotenzellen leicht erniedrigt ($3,10 \pm 0,48$; $n=3$). Bei den anderen Konzentrationen des Antikörpers JJ319 lagen die Werte im Bereich der Kontrolle, d.h. der unbeeinflussten T-Zellproliferation: 10 $\mu\text{g/ml}$: $4,6 \pm 0,25$; 1 $\mu\text{g/ml}$: $4,9 \pm 0,88$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$: $4,7 \pm 0,45$; jeweils $n=3$).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Interleukin-2 für die Auto-stimulation ein wichtiger kostimulatorischer Signalüberträger ist. Das über den Rezeptor CD28 vermittelte kostimulatorische Signal hat dagegen unter den hier gewählten Bedingungen keinen wesentlichen Effekt auf die Restimulation.

Anders scheint die Situation zu sein, wenn dendritische Zellen die Restimulation induzieren. Die Blockade von CD28 führt hier zu einer deutlichen Hemmung der

4 Ergebnisse

T-Zell-Proliferation (Abb. 4.25). Die höchste Antikörperkonzentration von 50 µg/ml JJ319 brachte die Proliferation völlig zum Erliegen ($0,2 \pm 0,02$; $n=3$), aber auch in den niedrigeren Konzentrationen hemmte der Antikörper JJ319 die T-Zell-Proliferation (10 µg/ml: $2,0 \pm 0,5$; 1 µg/ml: $3,7 \pm 0,9$; 0,1 µg/ml: $7,2 \pm 1,5$; jeweils $n=3$). In Abbildung 4.25 ist zusätzlich auch die Wirkung von OX6 dargestellt. Dieser Antikörper inhibiert die Proliferation in Anwesenheit antigen-

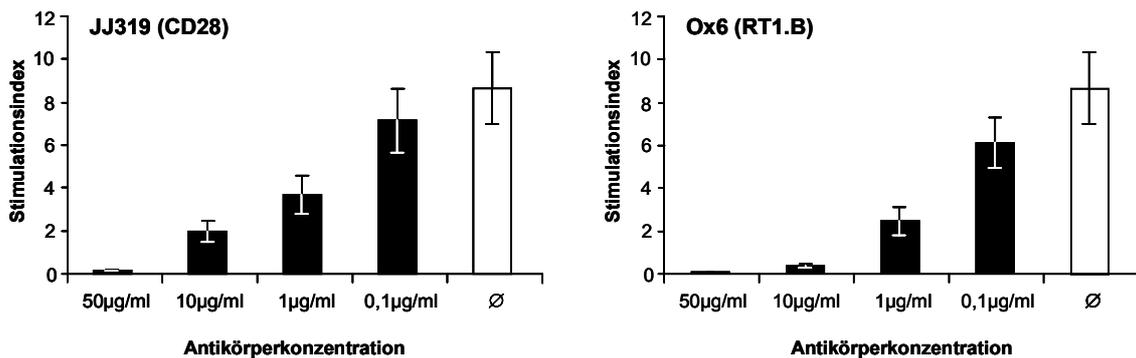


Abbildung 4.25: T-Zell-Proliferation nach Blockade des CD28-Moleküls mit JJ319 bzw. des MHC-Klasse-II-Moleküls mit OX6 in Anwesenheit dendritischer Zellen nach Zugabe von P1. Beide Antikörper führten zu einer starken Hemmung der Restimulation im T-Zell-Proliferationsassay (vergl. mit Abb. 4.22 und 4.24). Ø = kein Antikörper.

präsentierender Zellen ähnlich stark wie bereits für die Autostimulation gezeigt wurde: 50 µg/ml: $0,03 \pm 0,01$; 10 µg/ml: $0,3 \pm 0,1$; 1 µg/ml: $2,4 \pm 0,6$; 0,1 µg/ml: $6,1 \pm 1,2$ (jeweils $n=3$). Die sehr niedrige Proliferation bei 50 µg/ml Antikörper könnte auch auf einen anderen Effekt beruhen als den blockierenden Effekt des Antikörpers (siehe hierzu auch Kommentar zur Abb. 4.24 im Text).

Die Kontrolle mit Mausserum (Abb. 4.26) hatte keinen großen Einfluss auf die Proliferation. Bei allen vier Konzentrationen lag die Proliferation auf dem Niveau der Kontrollwerte (50 µg/ml: $4,5 \pm 0,75$; 10 µg/ml $4,8 \pm 0,60$; 1 µg/ml: $4,6 \pm 0,71$; 0,1 µg/ml: $4,5 \pm 0,77$; jeweils $n=3$).

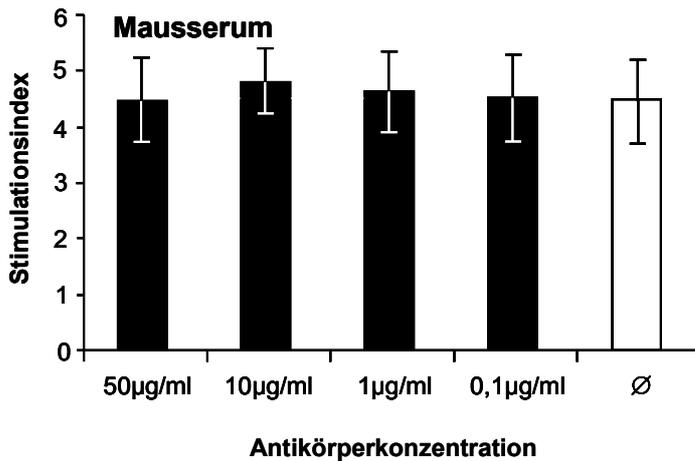


Abbildung 4.26: T-Zell-Proliferation nach Zugabe von Mausserum. Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils drei Versuchen. Ø = kein Antikörper.

Um auszuschließen, dass die oben angeführten Ergebnisse vom Peptidantigen P1 abhängig waren, wurden diese Blockierungsexperimente mit dem MHC-Klasse-II-Peptid R1.D2 wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie waren vergleichbar mit den mit P1 erzielten Ergebnissen (s. Appendix).

Zusammenfassung von Kapitel 4.2: Die Proliferation antigenspezifischer Lymphknotenzellen in Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen betrug nach Zugabe von Peptidantigen P1 ca. 50% der durch dendritische Zellen vermittelten Proliferation (Abb. 4.14). Für diese sogenannte Autostimulation scheinen MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten verantwortlich zu sein. Sie präsentieren wie antigenpräsentierende Zellen das Antigen über MHC-Klasse-II-Moleküle. Nach Immunisierung mit P1 verdreifachte sich der Anteil MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten auf ca. 10% (Abb. 4.16). Nach ihrer Depletion war keine Proliferation für die verbliebenen MHC-Klasse-II-negativen T-Lymphozyten nach Zugabe von P1 mehr festzustellen (Abb. 4.20/21). Die

Bedeutung der MHC-Klasse-II-Moleküle für die Autostimulation wurde auch in Inhibitionsversuchen mit den Antikörpern OX6 (RT1.B) und OX17 (RT1.D) deutlich. Dabei führte die Blockade des RT1.B-Lokus mehr als die Blockade des RT1.D-Lokus zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Proliferation (Abb. 4.22). Das Peptidantigen P1 scheint somit in erster Linie von MHC-Klasse-II-Molekülen des RT1.B-Lokus präsentiert zu werden, während MHC-Klasse-I-Moleküle offenbar keine Bedeutung für die Autostimulation haben. Ihre Blockade mit dem Antikörper OX18 (RT1.A) führte jedenfalls zu keiner wesentlichen Reduktion der Proliferation (Abb. 4.23). Auch kostimulatorische Signale sind für die Autostimulation von großer Bedeutung. Die Blockade des Interleukin-2-Rezeptors mit 50 µg/ml des Antikörpers NDS61 brachte die Proliferation der T-Lymphozyten völlig zum Erliegen. Die Blockade des kostimulatorischen Moleküls CD28 mit dem Antikörper JJ319 hatte nur geringe Auswirkungen auf die Autostimulation (Abb. 4.24), führte jedoch zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation in Anwesenheit dendritischer Zellen (Abb. 4.25). Mausserum hatte keinen Einfluss auf die Proliferation (Abb. 4.26).

5 Beantwortung der Fragen

1. Das allogene Peptid P1 aktivierte nach subkutaner Applikation das Immunsystem der Lewis-Ratte. Welche Auswirkung hatte diese Immunisierung auf die Lymphozytenpopulation in den lokalen Lymphknoten?

Die subkutane Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 führte zu einer deutlichen Vergrößerung der poplitealen Lymphknoten, da sich die Zahl der Lymphknotenzellen von $2,3 \times 10^7$ Zellen auf $8,9 \times 10^7$ Zellen nahezu vervierfachte (Abb. 4.1). Die Immunantwort war lokal begrenzt, und P1-spezifische T-Lymphozyten waren nur in den poplitealen und iliakalen Lymphknoten nachzuweisen (Abb. 4.3). Die prozentuale Verteilung von B- und T-Lymphozyten veränderte sich zugunsten der B-Lymphozyten; diese verdoppelten ihren Anteil (Abb. 4.2). Durchflusszytometrische Analysen zeigten außerdem, dass sich der Anteil MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten nach Immunisierung verdreifachte (Abb. 4.16).

2. Im T-Zell-Proliferationsassay wurde die *in vitro* Proliferation restimulierter antigenspezifischer T-Lymphozyten in Gegenwart von antigenpräsentierenden Zellen bestimmt.

a) Welches sind die Charakteristika dieses Assays?

Im T-Zell-Proliferationsassay wurden die durch Immunisierung mit P1 induzierten antigenspezifischen T-Lymphozyten *in vitro* mit demselben Peptidantigen restimuliert. Die Proliferation dieser P1-spezifischen Zellen, ihr Anteil lag unter 5% der Lymphknotenzellen, wurde über den Einbau von radioaktivem Thymidin gemessen (Abb. 4.4). Neben seiner Sensitivität zeichnete sich der T-Zell-Proliferationsassay durch seine Spezifität aus. Die antigenspezifischen T-

Lymphozyten proliferierten nur in Anwesenheit des Antigens, das zuvor auch für die Immunisierung verwendet wurde (Abb. 4.5).

b) Was sind die sensitivitätsbestimmenden Parameter?

Die sensitivitätsbestimmenden Parameter des T-Zell-Proliferationsassays waren neben der Anzahl der Lymphknotenzellen und antigenpräsentierenden Zellen auch die Peptidmenge, die für die Restimulation verwendet wurde, sowie die Inkubationsdauer. Optimale Proliferationswerte wurden mit 10^5 bis 10^6 pLNC (Abb. 4.6), 10^4 dendritische Zellen (Abb. 4.7), einer Peptidmenge von mindestens $8,3 \mu\text{g/ml}$ (Abb. 4.8) und einer Inkubationsdauer von 72 Stunden (Abb. 4.9) erzielt. Zusätzlich beeinflusste auch die Art der antigenpräsentierenden Zellen die Proliferation. Dendritische Zellen waren als professionelle antigenpräsentierende Zellen für den T-Zell-Proliferationsassay ausgezeichnet geeignet, während B-Lymphozyten erst nach ihrer Stimulierung mit Ionomycin und PMA als potente antigenpräsentierende Zellen zu verwenden waren.

3. Nach der Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 entstanden T-Lymphozyten, die MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimierten.

a) Welche Eigenschaften im T-Zell-Proliferationsassay sind für diese Zellen charakteristisch?

Die Fähigkeit zur Autostimulation war von der Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls abhängig. Etwa 10% der T-Lymphozyten exprimierten diese Oberflächenmoleküle nach Immunisierung mit P1 (Abb. 4.16). Die durch diese

Autostimulation induzierte T-Zell-Proliferation betrug 50% der durch dendritische Zellen vermittelten Proliferation (Abb. 4.14).

b) Lassen sich kostimulatorische Oberflächenmoleküle identifizieren, die an der Autostimulation beteiligt sind?

Wie bereits erwähnt, ist die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen wichtig für die Autostimulation. Wurden nämlich die MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten depletiert, so war unter den MHC-Klasse-II-negativen T-Lymphozyten keine Autostimulation nach Zugabe von P1 mehr nachweisbar (Abb. 4.21). Auch die Inhibition des MHC-Klasse-II-Moleküls mit dem Antikörper OX6 führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Proliferation im T-Zell-Proliferationsassay (Abb. 4.22). Ebenfalls beeinflussten kostimulatorische Signale die Autostimulation, wie die erfolgreiche Blockade des IL-2-Rezeptors mit dem Antikörper NDS61 zeigte (Abb. 4.24). Die Inhibition des kostimulatorischen Moleküls CD28 mit dem Antikörper JJ319 hatte dagegen keinen wesentlichen Einfluss auf die Autostimulation (Abb. 4.24).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach Immunisierung mit dem Peptid P1 antigenspezifische T-Lymphozyten entstehen, von denen 10% MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Abb. 4.16). Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Zellen zur Autostimulation befähigt waren (Abb. 4.21). Ihr Nachweis gelang im T-Zell-Proliferationsassay; hierzu wurden sie mit P1 restimuliert (Abb. 4.5).

6.1 Die T-Zell-vermittelte Antigenpräsentation

MHC-Klasse-II-Moleküle wurden auf aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten der Ratte (Sopori ML et al., 1985; Reizis B et al., 1994), der Maus (Michaelides M und McKenzie IF, 1981) und des Menschen (Evans RL et al., 1978; Hewitt CR und Feldmann M, 1989; Barnaba V et al., 1994; Holling TM et al., 2004a) nachgewiesen. Auch sind aktivierte T-Lymphozyten von Rind (Isaacson JA et al., 1998), Pferd (Bendali-Ahcene S et al., 1997) und Kaninchen (Doveren RF et al., 1986) positiv für MHC-Klasse-II-Moleküle.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Teil der alloreaktiven T-Lymphozyten der Lewis-Ratte, die nach subkutaner Immunisierung mit P1 aus den regionalen Lymphknoten isoliert wurden, MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierten (Abb. 4.16). Bereits vor Immunisierung mit P1 waren 3% der T-Lymphozyten MHC-Klasse-II-positiv. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Doveren RF et al., die ebenfalls MHC-Klasse-II-Moleküle auf nicht-aktivierten T-Lymphozyten nachwiesen (Doveren RF et al., 1986). Die Immunisierung mit P1 führte zu einer Verdreifachung der MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten auf rund 10%. Die Stärke der MHC-Klasse-II-Expression auf T-Lymphozyten war dabei um den Faktor 10 geringer als auf B-Lymphozyten (linker oberer Quadrant in Abb. 4.16). Auch Walker und Mannie konnten zeigen, dass die Stärke der MHC-Klasse-II-Expression auf T-Lymphozyten 10- bis 50-fach schwächer war als auf antigenpräsentierenden Zellen (Walker MR und Mannie MD, 2002).

Ungefähr 3 bis 5 Tage nach T-Zell-Aktivierung ist die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen nachzuweisen (Holling TM et al., 2004b). Dies ist eine lange Zeitspanne verglichen mit der bereits wenige Stunden nach Aktivierung beginnenden Synthese und Sezernierung von Interferon- γ und Interleukin-2. In den eigenen Experimenten war eine MHC-Klasse-II-Expression 7 Tage nach Immunisierung mit P1 deutlich nachzuweisen.

Die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen stellt eine wesentliche Voraussetzung dar, damit Zellen von außen aufgenommene Antigene präsentieren können. Austin et al. transfizierten erfolgreich Maus-Fibroblasten mit der genetischen Information für das humane MHC-Klasse-II-Molekül HLA-DP. Dieses Molekül wurde auf der Zelloberfläche exprimiert und war auch in der Lage, Antigen zu präsentieren (Austin P et al., 1985). Evans et al. beschrieben bereits 1978, dass T-Lymphozyten die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen übernehmen können (Evans RL et al., 1978). Spätere Studien bestätigten diese T-Zell-vermittelte Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle, die als Autostimulation bezeichnet wird (Lanzavecchia A et al. 1988; Hewitt CR und Feldmann M, 1989; LaSalle JM et al., 1991; Barnaba V et al., 1994; Broeren CP et al., 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Präsenz aktivierter, MHC-Klasse-II-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen. Diese Zellen präsentierten das Peptidantigen P1 über eigene MHC-Klasse-II-Moleküle und sind zur Autostimulation befähigt, da die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper OX6 bzw. die selektive Depletion der MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten die Autostimulation zum Erliegen brachte (Kapitel 4.2.2).

Damit MHC-Klasse-II-positive CD4⁺ T-Lymphozyten auch andere T-Lymphozyten erfolgreich reaktivieren können, sind neben dem ersten Signal, das über die Bindung des MHC-Klasse-II/Peptid-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor ausgelöst wird, weitere kostimulatorische Signale erforderlich (Bretscher P und Cohn M, 1970). Die Interaktion der Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf antigenpräsentierenden Zellen mit den Oberflächenmolekülen

CD28 und CD152 (CTLA-4) auf T-Lymphozyten gelten als elementare kostimulatorische Signalwege (June CH et al., 1994; Agadjanyan MG et al., 1999). Tatsächlich wurden CD80 (Azuma M et al., 1993) und CD86 (Prabhu Das MR et al., 1995) auch auf aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen. Die Interaktion von CD86 mit CD28 ist für die T-Zell-Aktivierung bedeutsam, während die Interaktion zwischen CD80 und CD152 die Aktivierung herunterreguliert (June CH et al., 1994; Sharpe AH et al., 2002). Die Bedeutung der Kostimulation für die Autostimulation wurde in dieser Arbeit durch Blockierung des IL-2-Rezeptors und des CD28-Moleküls mit monoklonalen Antikörpern überprüft (Abb. 4.24). Die Inhibition des IL-2-Rezeptors mit NDS61 hemmte effektiv die Restimulation im T-Zell-Proliferationsassay (Abb. 4.24). Dies wird auch von Hewitt und Feldmann (1989) sowie DeSilvia et al. (1991) bestätigt. Die Blockade des CD28-Moleküls hatte hingegen keine wesentliche Auswirkung auf die Autostimulation (Abb. 4.24). Dagegen führte die Blockade des CD28-Moleküls bei Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen zum Erliegen der T-Zell-Proliferation (Abb. 4.25). So lässt sich z.B. mit dem anti-CD28-Antikörper JJ319 die Transplantatabstoßung erfolgreich verzögern. Dengler et al. berichteten, dass unter dem Einfluss von JJ319 das Transplantatüberleben von 7 Tagen auf 5 Wochen gesteigert werden konnte (Dengler T et al., 1999).

6.2 Die biologische Funktion MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten

Aktivierte T-Lymphozyten können somit Antigene über eigene MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren und exprimieren zusätzlich auch kostimulatorische Signale wie z.B. CD80 und CD86. Solche T-Lymphozyten weisen damit alle Voraussetzungen auf, um andere T-Lymphozyten zu aktivieren. Doch ist die biologische Bedeutung dieser Autostimulation durch MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten bisher nicht geklärt. So konnten einige Autoren zeigen, dass die T-Zell-vermittelte Antigenpräsentation immunregulatorische Funktionen aufweist, da diese Autostimulation Apoptose als „*activation-induced cell death*“ (O’Hehir RE et al., 1990; LaSalle JM et al., 1992) und Anergie in den

„Responder“-T-Lymphozyten auslöst (Lamb JR et al., 1983; Lamb JR und Feldmann M, 1984; Celis E und Saibara T, 1992; Mannie MD und Norris MS, 2001; Lombardi G et al., 1996; Satyaraj E et al., 1994). Sowohl Apoptose als auch Anergie verhindern die Akkumulation antigenspezifischer aktivierter T-Lymphozyten, wenn das entsprechende Antigen bereits beseitigt ist (Pichler WJ et al., 1994). 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; Mueller DL et al., 1991; Lechler RI et al., 2001).

Der Begriff Anergie wurde von Nossal und Pick eingeführt, um ein Stadium der Nichtreaktivität von B-Lymphozyten zu beschreiben (Nossal GJ und Pick BL, 1980). Inzwischen spricht man bei einer Vielzahl funktioneller Limitierungen auch bei T-Lymphozyten von Anergie. In der Tat konnten LaSalle et al. zeigen, dass antigenpräsentierende T-Lymphozyten Anergie induzieren, da ihnen kostimulatorische Moleküle fehlten (LaSalle JM et al., 1994). Dagegen spricht jedoch der Nachweis von CD80 und CD86 auf aktivierten T-Lymphozyten (Lamb JR und Feldmann M, 1984; LaSalle JM et al.; 1991). Dies muss jedoch nicht ein Widerspruch sein, da z.B. die Interaktion zwischen den beiden Oberflächenmolekülen CD80 und CD152 eine hemmende Wirkung auslöst (June CH et al., 1994; Sharpe AH et al., 2002). Die Hochregulierung von CD80 könnte folglich zu Anergie führen. Holling et al. zeigten, dass MHC-Klasse-II-positive Maus-T-Lymphozyten naive T-Lymphozyten zur Proliferation und IL-2-Sekretion führten, während sie dagegen in aktivierten, MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten Apoptose und Anergie auslösten (Holling TM et al., 2004b). Dies bestätigen auch Messungen über den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle: Dieser ist geringer, wenn MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten untereinander agieren als bei der Interaktion von MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen. Damit verbunden ist auch eine geringere Ausschüttung von IL-2, wodurch die Induktion von Anergie begünstigt wird.

Andere Autoren dagegen schreiben der Antigenpräsentation durch T-Lymphozyten eine die Proliferation fördernde Wirkung zu (Lanzavecchia A et al., 1988; LaSalle JM et al., 1991; Nisini R et al., 1992). So beobachtete LaSalle et al. (1992), dass MBP (myelin basic proteine)-reaktive T-Zelllinien MBP-Fragmente erkannten, die ihnen durch aktivierte autologe T-Zellen präsentiert wurden und proliferierten darauf hin. Auch Hewitt und Feldmann beschrieben CD4+ T-Zelllinien, die in Gegenwart von Antigen (Influenza HA, Aminosäure 306-330) deutlich proliferierten (Hewitt CR und Feldmann H, 1989). Dabei induzierte die Antigenpräsentation durch diese Zellen eine geringere Proliferation als die Antigenpräsentation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den eigenen Beobachtungen überein, nach denen MHC-Klasse-II-positive P1-spezifische T-Lymphozyten in Abwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen T-Zell-Proliferation induzierten. Diese Proliferation lag bei 50% der durch dendritische Zellen vermittelten Proliferation. Die proliferationsfördernde Wirkung der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten spricht dafür, dass solche Zellen die Immunantwort aufrechterhalten oder sogar verstärken können. Doch wird die Immunantwort nicht zwangsläufig durch das Fehlen MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten eingeschränkt (Holling TM et al., 2004b).

Die Funktion MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten bleibt somit auch weiterhin ein kontroverses Thema. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der durchgeführten Experimente eine durch MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten vermittelte protektive Wirkung nicht beobachtet. Im Gegenteil, P1-beladene MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten induzierten eine deutliche Proliferation im T-Zell-Proliferationsassay. Außerdem belegen Daten der eigenen Gruppe, dass die Transplantatabstoßung nach heterotoper Herztransplantation (WF) durch die Übertragung poplitealer Lymphknotenzellen, die durch Immunisierung mit P1 aktiviert waren, beschleunigt wurde (Sitaru AG et al., 2002). Hierunter befanden sich, wie Abb. 4.16 zeigt, auch MHC-Klasse-II-positive T-Lymphozyten.

6.3 MHC-Klasse-II-Moleküle auf T-Lymphozyten: Ein aktiver Mechanismus?

Bleibt noch die Frage zu klären, ob T-Lymphozyten in der Lage sind, MHC-Klasse-II-Moleküle selbst zu synthetisieren. Für diese Fähigkeit sprechen einige interessante Beobachtungen. Die Expression der MHC-Klasse-II-Gene wird durch den sogenannten Klasse-II-Transaktivator (*class-II-transactivator*) oder CIITA reguliert (Van den Elsen PJ et al., 1998). Die Regulation von CIITA auf Transkriptionsebene wird durch verschiedene Promotoren gesteuert, wobei zur Zeit drei Promotoreinheiten bekannt sind (Muhlethaler-Mottet A et al., 1997). Die Promotoren CIITA-PI und CIITA-PIII ermöglichen die konstitutive Expression von CIITA u.a. in dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, während der Promotor CIITA-PIV an der Interferon- γ -induzierten CIITA-Expression beteiligt ist. In aktivierten humanen T-Lymphozyten wird dabei die Expression der MHC-Klasse-II-Moleküle exklusiv durch die Promotoreinheit CIITA-PIII kontrolliert (Holling TM et al., 2004a). Holling et al. konnten zeigen, dass eine fehlende MHC-Klasse-II-Expression auf T-Lymphozyten mit einer fehlenden Expression von CIITA einhergeht (Holling TM et al., 2004a). Neben ihrer Funktion bei der Antigenpräsentation scheinen MHC-Klasse-II Moleküle insbesondere bei T-Lymphozyten als Rezeptor zur Signaltransduktion von Bedeutung zu sein (Di Rosa F et al., 1993).

Eine weitere Möglichkeit der MHC-Klasse-II-Expression auf der Oberfläche von T-Lymphozyten ist die Übernahme dieser Moleküle von anderen T-Lymphozyten oder antigenpräsentierenden Zellen (Lanzavecchia A, 1990; Patel DM et al., 1999). Dabei scheint die Interaktion zwischen T-Lymphozyt und antigenpräsentierender Zelle den interzellulären Transfer von MHC-Klasse-II-positiven Vesikeln zu fördern (Arnold PY et al., 1997; Arnold PY und Mannie MD, 1999). Diese Fähigkeit wurde kürzlich auch für T-Lymphozyten der Maus nachgewiesen (Tsang JY et al., 2003). Die Grundlagen eines solchen Molekültransfers sind jedoch noch nicht geklärt.

Somit scheinen zwei Mechanismen in Frage zu kommen, wie aktivierte T-Lymphozyten zu MHC-Klasse-II-Molekülen „kommen“; entweder durch eigene Synthese oder durch Übernahme der „fertigen“ Oberflächenmoleküle. Abgesehen davon, welcher dieser beiden Mechanismen sich die T-Lymphozyten bedienen, bedarf es noch weiterer intensiver Untersuchungen, um die Bedeutung MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten für die Immunregulation zu verstehen.

Als gesichert gilt, dass T-Lymphozyten nicht in der Lage sind, selbst Antigene zu prozessieren. Experimente von Hewitt und Feldmann zeigen, dass antigenspezifische CD4⁺ T-Lymphozyten in Gegenwart von Virusprotein-Fragmenten (Influenza HA, Aminosäure 306-330), nicht aber des gesamten Virusproteins proliferierten (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. Ebenfalls wird das MBP (*myelin basic protein*) nicht von T-Lymphozyten prozessiert (LaSalle JM et al., 1991).

6.4 Überlegungen zu einem antigenspezifischen Therapiekonzept mit MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten

Die MHC-Klasse-II-Moleküle auf CD4⁺ T-Lymphozyten lassen sich, wie auch die MHC-Klasse-II-Moleküle dendritischer Zellen, von außen mit synthetischen Peptiden beladen. Diese Fähigkeit ließe sich möglicherweise therapeutisch ausnutzen, um eine Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation zu verhindern oder zumindest abzuschwächen.

Hierfür sind besondere Antigene notwendig, die in der Lage sind, eine Immunantwort abzuschalten (Sloan-Lancaster J und Allen PM, 1996). Prinzipiell ist es möglich, durch kleinste Änderungen der Aminosäuresequenz von MHC-Peptiden die Immunantwort gegen das ursprüngliche Peptid zu modulieren (Sloan-Lancaster J und Allen PM, 1996; Collins EJ und Frelinger JA, 1998;

Akdis CA und Blaser K, 2000; Sitaru AM et al., 2003). Die Vorstellung ist, auto-
 loge, antigenspezifische, MHC-Klasse-II positive CD4+ T-Lymphozyten mit sol-
 chen immunregulatorischen Peptiden zu beladen, um sie anschließend dem
 Zellspender zurückzugeben. Sie wandern in das Transplantat ein und könnten,
 so zumindest die Vorstellung, vor Ort die Immunantwort hemmen (Abb. 6.1).
 Hierbei handelt es sich bisher um theoretische Überlegungen, für die noch
 keine experimentellen Daten vorliegen.

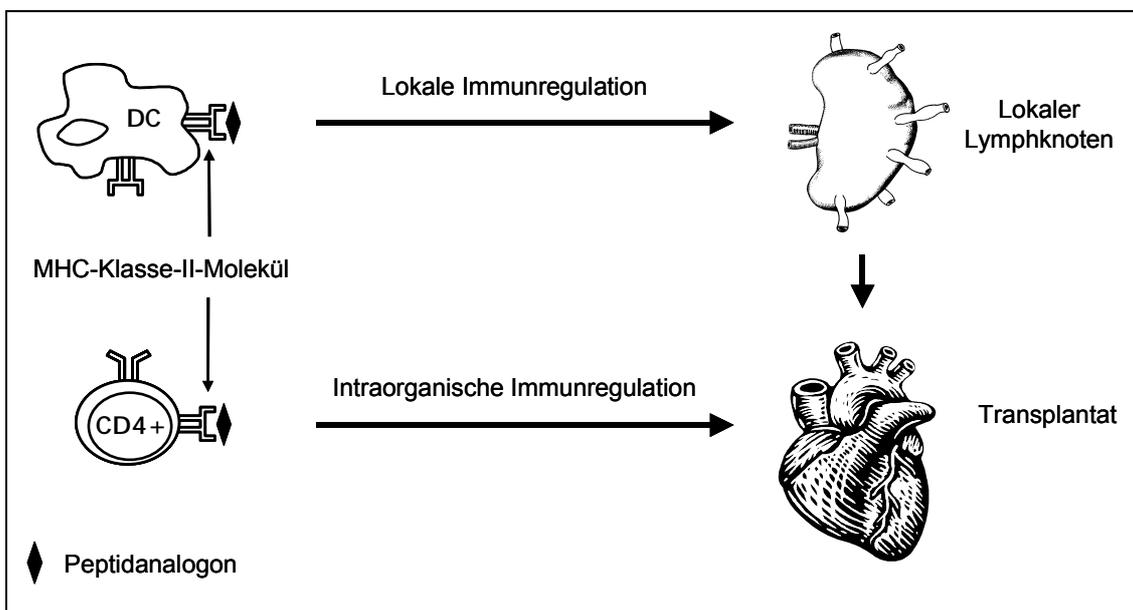


Abbildung 6.1: Vorstellungen zu einem möglichen therapeutischen Ansatz auf der Basis antigenspezifischer, MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten. Diese Zellen werden mit immunmodulatorischen Peptidvarianten beladen, die in der Lage sind, eine Immunantwort zu hemmen. Mit solchen Peptiden beladene T-Lymphozyten wandern in das transplantierte Organ ein, um dort die Immunantwort zu hemmen. Hierbei wird ausgenutzt, dass antigenspezifische T-Lymphozyten die Ursache ihrer Aktivierung suchen und somit spezifisch „homen“ (Westermann J und Bode U, 1990). Möglicherweise könnte eine solche T-Zell-basierte Strategie Ansätze mit dendritischen Zellen ergänzen bzw. optimieren. Dendritische Zellen wandern in erster Linie in die lokalen Lymphknoten und bewirken dort eine Immunregulation.

7 Ausblick

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit war die Beobachtung, dass aktivierte MHC-Klasse-II-positive CD4⁺ T-Lymphozyten der Lewis-Ratte zur Autostimulation befähigt sind.

Aktivierte T-Lymphozyten wurden durch Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 induziert und ließen sich *in vitro* im T-Zell-Proliferationsassay nach Zugabe von P1 über ihre Proliferation nachweisen. Solche P1-spezifischen T-Lymphozyten beschleunigen die Transplantatabstoßung von WF-Herztransplantaten in Lewis-Ratten (Sitaru AG et al., 2002). Jedoch ist derzeit nicht geklärt, ob die MHC-Klasse-II-positiven antigenspezifischen T-Lymphozyten für diese Abstoßung verantwortlich sind. Sollte die von Mannie et al. (2001) beschriebene Beobachtung, dass die Autostimulation zur Induktion von Apoptose und Anergie aktivierter T-Lymphozyten führt, auch für die *in vivo* Situation zutreffen, so scheint dieser Effekt nicht stark genug zu sein, um eine Abstoßung zu verhindern. Weiterhin ist auch nicht geklärt, ob sich über die durch Autostimulation ausgelösten Effekte Möglichkeiten ergeben, die Transplantatabstoßung antigenspezifisch zu verhindern oder gar Toleranz zu induzieren. In weiterführenden Untersuchungen sollte deshalb die Funktion MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten intensiver untersucht werden.

8 Zusammenfassung

Nach der Übertragung MHC-differenter Organtransplantate sind die Transplantatempfänger auf eine lebenslange Immunsuppression angewiesen, um die Zerstörung des fremden Organs zu verhindern. Da hierzu jedoch das gesamte Immunsystem supprimiert wird, sind solche Patienten einem erhöhten Risiko ausgesetzt, an Infektionen oder Tumoren zu erkranken. Neue therapeutische Ansätze sind somit erforderlich, die Transplantatabstoßung selektiv zu hemmen. Im Mittelpunkt solcher Strategien steht die gezielte Beeinflussung alloreaktiver CD4+ T-Lymphozyten, da sie für die Aktivierung weiterer Immunzellen, wie zytotoxische T-Lymphozyten, B-Lymphozyten oder Makrophagen, von Bedeutung sind. Die alloreaktiven T-Lymphozyten selbst werden durch allogene Peptide aktiviert, die von den Spender-MHC-Molekülen stammen.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Auswirkungen des Peptidantigens P1, das an der zur Abstoßung führenden Immunantwort beteiligt ist, auf die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten zu untersuchen. Die subkutane Immunisierung mit P1 führte zur Induktion antigenspezifischer T-Lymphozyten in den poplitealen und iliakalen Lymphknoten. Dabei verdreifachte sich der Anteil MHC-Klasse-II-positiver T-Lymphozyten auf 10% der Lymphknotenzellen. Die antigenspezifischen und MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten ließen sich im T-Zell-Proliferationsassay nach Zugabe von P1 nachweisen. Diese T-Zell-vermittelte Restimulation wird als Autostimulation bezeichnet und machte 50% der durch dendritische Zellen vermittelten Proliferation aus. Sowohl die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem monoklonalen Antikörper OX6, als auch die selektive Entfernung dieser Zellen hemmte die Autostimulation. Neben der Präsentation des Antigens über die Selbst-MHC-Klasse-II-Moleküle des RT1.B-Lokus war für die Autostimulation die Signalübertragung über den IL-2-Rezeptor von Bedeutung. Während dessen hatte die Blockade des kostimulatorischen Moleküls CD28 keine wesentlichen Auswirkungen auf die Autostimulation. Im Gegensatz zu Literaturdaten wurde eine immunregulatorische Funktion dieser zur Autostimulation fähigen

gen T-Lymphozyten im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit gezeigt, dass die durch Immunisierung mit dem Alloantigen P1 antigenspezifische T-Lymphozyten entstehen, die MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Weiter wurde gezeigt, dass diese MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten zur Autostimulation befähigt sind. Welche Bedeutung und Funktion diese Zellen für die Immunantwort nach Transplantation haben, ist gegenwärtig nicht bekannt. Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen sollen jedoch die Immunbiologie dieser Zellen klären.

9 Literaturverzeichnis

- Agadjanyan MG**, Kim JJ, Trivedi M, Wilsin D, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, Chalian AA, Maldonado MA, 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
- Akdis CA**, Blaser K. Regulation of specific immune responses by chemical and structural modifications of allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 261-269
- Arnold PY**, Davidian DK, Mannie MD. Antigen presentation by T cells: T cell receptor ligation promotes antigen acquisition from professional antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3198-3205
- Arnold PY**, Mannie MD. Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 1363-1373
- Auchincloss H**, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. 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
- Austin P**, Trowsdale J, Rudd C, Bodmer W, Feldmann M, Lamb J. Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts. *Nature* 1985; 313: 61-64
- 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**, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992; 175: 305-308
- 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
- Bretscher P**, Cohn M. A theory of self-nonsel discrimination. *Science* 1970; 169: 1042-1049
- Broeren CP**, Wauben MH, Lucassen MA, van Meurs M, van Kooten PJS, Boog CJ, 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
- Chowdhury NC**, Saborio DV, Garrovillo M, Chandraker A, Magee CC, Waaga AM, Sayegh MH, Jin MX, Oluwole SF. Comparative studies of specific acquired systemic tolerance induced by intrathymic inoculation of a single synthetic Wistar-Furth (RT1^U) allo MHC class I (RT1.A^U) peptide or WAG (RT1.^U)-derived class I peptide. *Transplantation* 1998; 66: 1059-1066
- Cobbold SP**. New trends in immunosuppression. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1-5
- Collins EJ**, Frelinger JA. Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptide complexes. *Immunol Rev* 1998; 163: 151-160
- Dengler TJ**, Szabo G, Sido B, Nottmeyer W, Zimmerman R, Vahl CF, Hünig T, Meuer SC. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by

modulating CD28 antibody JJ319 after highresponder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 392-398

Di Rosa F, D'Oro U, Ruggiero G, Racioppi L, Acquaviva A, Ferrone S, Fontana S, Zappacosta S. HLA class II molecules transduce accessory signals affecting the CD3 but not the interleukin-2 activation pathway in T blasts. *Hum Immunol* 1993; 38: 251-260

DeSilvia D, Urdahl KB, Jenkins MK. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupation in the absence of proliferation. *J Immunol* 1991; 147: 3261-3267

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

Gjertson DW, Cecka JM, Teraski PI: The relative effects of FK 506 and cyclosporine on short- and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 1995; 60: 1384-1388

Gjertson DW. Survival trends in long-term first cadaver-donor kidney transplants. *Clin Transpl* 1991; 225-225

Gorantla VS., Barker JH, Jones JW, Prabhune K, Maldonado C, Granger MD. Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery* 2000; 20: 420-429

Haspot F, Villemain F, Laflamme G, Coulon F, Olive D, Tiollier J, Souillou JP, Vanhove B. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228-2234

Henry ML. Cyclosporin and tacrolimus (FK 506): A comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant* 1999; 13: 209-220

Hewitt CR, Feldmann M. Human T cell clones present antigen. *J Immunol* 1989; 143: 762-769

- Holling TM**, Schooten E, Langerak AW, van den Elsen PJ. Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies. *Blood* 2004a; 103: 1438-1444
- Holling TM**, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC Class II Molecules in T-Lymphocytes: Of Mice and Men. *Human Immunol* 2004b; 65: 282-290
- Hong JC**, Kahan BD. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present and future. *Semin Nephrol* 2000; 20: 108-125
- Hünig T**, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation, *J Exp Med* 1989; 169: 73-86
- 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
- Joly E**, Clarkson C, Howard JC, Butcher GW. Isolation of a functional cDNA encoding the RT1.A^U MHC class I heavy chain by a novel PCR-based method. *Immunogenetics* 1995; 41: 326-328
- June CH**, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; 15: 321-331
- 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 recognition in T cell tolerance induction. *Nature* 1984; 308: 72-74
- Lanzavecchia A**, Roosnek E, Gregory T, Berman P, Abrignani S. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* 1988; 334: 530-532
- Lanzavecchia A**. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class-II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 773-793

- LaSalle JM**, Ota K, Hafler DA. Presentation of autoantigen by human T cells. *J Immunol* 1991; 147: 774-780
- LaSalle JM**, Tolentino PJ, Freeman GJ, Nadler LM, Hafler DA. Early signaling defects in human T cells anergized by T cell presentation of autoantigen. *J Exp Med* 1992; 176: 177-186
- LaSalle JM**, Hafler DA. T cell anergy. *FASEB J* 1994; 8: 601-608
- 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**, Lombardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-88
- Lechler RI**, Chai JG, Marelli-Berg F, Lombardi G. The contributions of T-cell-anergy to peripheral T-cell-tolerance. *Immunol* 2001; 103: 262-269
- Lombardi G**, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 1990; 2: 9-13
- Lombardi G**, Hargreaves R, Sidhu S, Imami N, Lightstone L, Fuller-Espie S, Ritter M, Robinson P, Tarnok A, Lechler R. Antigen presentation by T cells inhibits IL-2 production and induces IL-4 release due to altered cognate signals. *J Immunol* 1996; 156: 2769-2775
- 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**. T cell-mediated antigen presentation: A potential mechanism of infectious tolerance. *Immunol Res* 2001; 23: 1-21
- 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 PA, Schwartz RH. Clonal anergy blocks the response to IL-4, as well as the production of IL-2, in dual-producing T helper 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
- Nisini R**, Matricardi PM, Fattorossi A, Biselli R, D'Amelio R. Presentation of superantigen by human T cell clones: a model of T-T cell interaction. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2033-2039
- Nossal GJ**, Pick BL. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1602-1606
- 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
- Opelz G**, Mickey MR, Terasaki PI. HLA matching and cadaver kidney survival in North America. Influence of center variation and presensitization. *Transplantation* 1977; 13: 490-449
- Otto C**, Timmermann W, Sitaru G, Jost S, Gassel HJ, Ulrichs K. Modulation der T-Zellreaktivität mit MHC-Peptiden: Eine Strategie zur selektiven Inhibierung der T-Zellantwort auf allogene Transplantate? *Transplantationsmedizin* 2001; 13: 21-31
- Otto C**, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Rohde AC, Lenhard M, Jost S, Gassel HJ, Ulrichs K, Timmermann W. Prolongation of small bowel allograft survival with a sequential therapy consisting of a synthetic MHC class II peptide and temporarily low-dose cyclosporine A. *Hum Immunol* 2002; 63: 880-887
- Patel DM**, Arnold PY, White GA, Nardella JP and Mannie MD: Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *J Immunol* 1999; 163: 5201-5210

- Pichler WJ**, Wyss-Coray T. T cells as antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1994; 15: 312-315
- Prabhu Das MR**, Zamvil SS, Borriello F, Weiner HL, Sharpe AH, Kuchroo VK. Reciprocal expression of costimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation. *Eur J Immunol* 1995; 25: 207-211
- 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
- Reizis B**, Schramm C, Cohen IR, 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. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1: 97-102
- Sayegh MH**, Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB. Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7762-7766
- Satyraj E**, Rath S, Bal V. Induction of tolerance in freshly isolated alloreactive T cells by activated T cell stimulators. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2457-2461
- Shapiro R**, Jordan M, Scantlebury V, Fung J, Jensen C, Tzakis A, McCauley J, Carroll P, Ricordi C, Demetris AJ, et al. FK 506 in clinical kidney transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 3065-3067
- Sharpe AH**, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 116-126
- Sherman LA**, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition, *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 385-402
- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Hierarchical Immunogenicity of Donor MHC Class I Peptides in Allograft Transplantation, *Human Immunol* 2002; 63: 871-879
- Sitaru AG**. Modulation of the T cell response with MHC class I peptides and their analogues: perspectives for an antigen-specific therapy in transplantation, Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg 2003

- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Allogeneic core amino acids of on immunodominant allopeptide are important for MHC binding and TCR recognition. *Hum Immunol* 2004; 65: 817-825
- Sloan-Lancaster J**, Allen PM. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 1-27
- 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
- Succhin EJ**, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166: 973-981
- Tsang JY**, Chai JG, Lechler R. Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II: peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood* 2003; 101: 2704-2710
- van den Berg TK**, Puklavec MJ, Barclay AN, Dijkstra CD. Monoclonal antibodies against rat leukocyte surface antigens. *Immunol Rev* 2001; 184: 109-116
- van den Elsen PJ**, Peijnenburg A, Van Eggermond MC, Gobin SJ. Shared regulatory elements in the promoters of MHC class I and class II genes. *Immunol Today* 1998; 19: 308-312
- Walker MR**, Mannie MD. Acquisition of functional MHC class II/peptide complexes by T cells during thymic development and CNS-directed pathogenesis. *Cell Immunol* 2002; 218: 13-25
- Walz MK**, Albrecht KH, Niebel W, Eigler FW. De novo malignant tumors during drug immunosuppression. The findings following 1245 cadaveric kidney transplants in 1080 patients. *Dtsch Med Wochenschr* 1992; 117: 927-934
- Westermann J**, Bode U. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol Today* 1999; 20: 302-307

Appendix

zu **Kapitel 3.6:** Die Einführung des Stimulationsindex ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimentalserien untereinander. Grundlage der Abb. 3.4 sind die Daten in Tabelle A.1.

	Proliferation ($\times 1.000$ cpm)			Stimulationsindex	
	pLNC/DC/P1	pLNC/DC	pLNC	pLNC/DC/P1	pLNC/DC
				pLNC	pLNC
Mittelwert	34,78	6,51	3,99	8,65	1,70
Stabw.	14,85	2,95	1,29	1,67	0,30
n	23	42	23	23	42

Tabelle A.1: Vergleich der cpm Daten mit den SI-Werten

zu **Kapitel 4.1.1:** Die durchschnittliche Zellgröße der poplitealen Lymphknoten-zellen nahm durch die Immunisierung mit P1 zu. Eine noch deutlichere Zunahme der Zellgröße konnte durch die unspezifische Stimulation der Zellen mit Ionomycin und PMA erreicht werden.

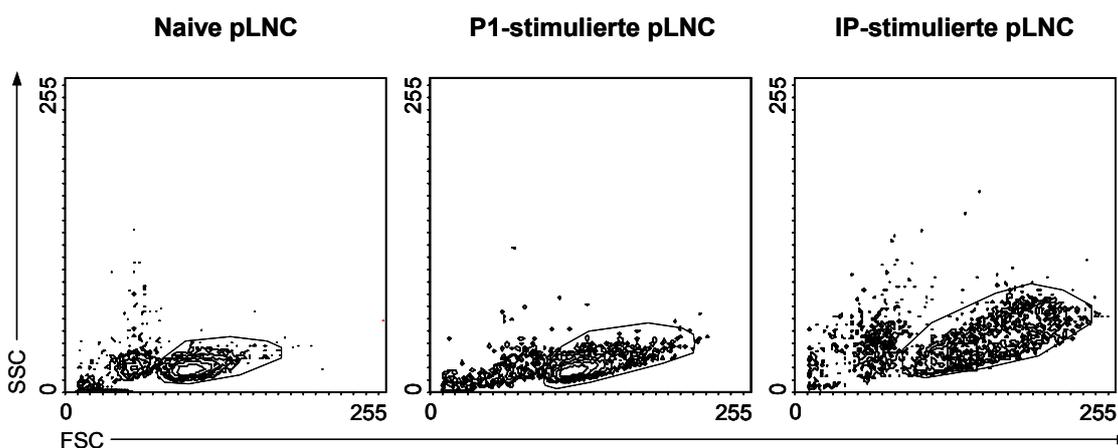


Abbildung A.1: Durchflusszytometrische Analyse: Dargestellt ist die Zellgröße der poplitealen Lymphknoten-zellen vor und nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 sowie nach Stimulation mit Ionomycin und PMA (IP).

zu Kapitel 4.1.1: Die Antigenpezifität alloreaktiver T-Lymphozyten: Die aus einer immunisierten Ratte isolierten Lymphknotenzellen (hierunter befinden sich die antigenspezifischen T-Lymphozyten) lassen sich im Proliferationsassay (Kapitel 3.5) nur mit dem Antigen restimulieren, mit dem zuvor auch immunisiert wurde. Die nachfolgende Tabelle zeigt dies am Beispiel P1-aktivierter Lymphknotenzellen. Pc oder P6 induzieren bei solchen P1-spezifischen T-Lymphozyten keine Proliferation.

	P1	P6	Pc	Ø
Mittelwert	8,65	2,43	1,77	1,70
Stabw.	1,67	0,40	0,21	0,30
n	23	2	3	42

Tabelle A.2: Mittelwerte und Standardabweichung (Stabw.) der Proliferation P1-aktivierter Lymphknotenzellen aus Lewis-Ratten nach Restimulation mit P1, P6, Pc bzw. ohne Peptidantigen (Ø) im T-Zell-Proliferationsassay (Kapitel 3.5). Die Zellen proliferierten nur in Gegenwart von P1, mit dem zuvor auch Lewis-Tiere immunisiert wurden. Der Proliferationsassay zeichnet sich somit durch eine hohe Spezifität aus (siehe auch Abb. 4.5).

zu Kapitel 4.1.2: Die Peptidmenge, die für die Restimulation verwendet wurde, variierte in einem Konzentrationsbereich von 0,026 und 33,33 µg/ml. Selbst geringe Konzentrationen führten zu deutlichen Proliferationswerten der T-Lymphozyten. Die Werte in Tab. A.3. sind Grundlage für die Abb. 4.8.

µg/ml	33,33	16,67	8,33	4,17	2,08	1,67	0,833	0,417	0,208	0,104	0,052	0,026	Ø
Mittelwert	8,54	8,40	8,42	6,28	5,76	5,57	5,12	5,07	4,93	4,35	3,94	2,03	2,01
Stabw.	1,23	2,01	1,27	0,77	0,80	1,35	1,37	1,34	1,40	1,425	1,12	0,45	0,54
n	4	4	6	2	2	3	4	4	4	3	4	1	8

Tabelle A.3: Mittelwerte und Standardabweichung (Stabw.) der Proliferation P1-aktivierter Lymphknotenzellen nach Restimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Peptidantigens P1. In der obersten Zeile ist die Peptidkonzentration angegeben. Ø = ohne P1.

zu Kapitel 4.1.3: Auch Makrophagen wurden auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation untersucht. Mit ansteigender Anzahl an Makrophagen sank die Proliferation. Die Isolierung von Makrophagen ist in Kapitel 3.7.4 beschrieben.

Makrophagen	∅	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Mittelwert	4,62	4,86	4,76	2,37	0,25	0,15
Stabw.	0,83	0,22	0,47	0,04	0,10	0,01
n	25	3	3	2	3	2

Tabelle A.4: Mittelwerte und Standardabweichung (Stabw.) der mit Makrophagen induzierten Proliferation P1-spezifischer Lymphknotenzellen im Proliferationsassay nach Zugabe von P1 (vergl. mit Abb. A.2).

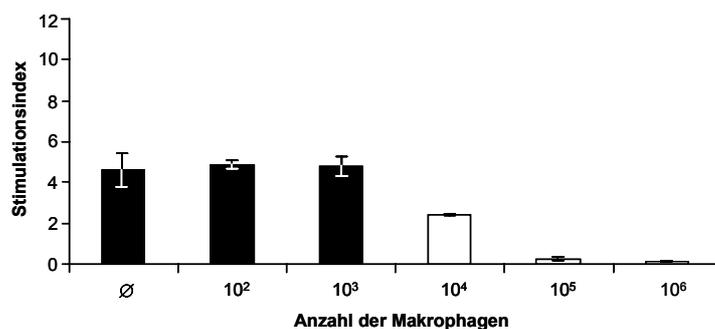


Abbildung A.2: Der Einfluss unterschiedlicher Anteile an Makrophagen als APC auf die T-Zell-Proliferation (vergl. mit Tab. A.4).

zu Kapitel 4.2.3: Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der Blockierungsexperimente möglicherweise vom Peptidantigen P1 abhängig waren, wurden diese Versuche mit dem MHC-Klasse-II-Peptid RT1.D2 (Sayegh MH et al., 1992) wiederholt. Hierfür wurden RT1.D2-aktivierte Lymphknotenzellen im T-Zell-Proliferationsassay mit RT1.D2 restimuliert. Folgende Antikörper wurden getestet: OX6 (anti-RT1.B), OX17 (anti-RT1.D), OX18 (anti-RT1.A), NDS61 (anti-IL-2R) und JJ319 (anti-CD28). Mausserum diente als Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Versuchsserie waren ähnlich wie die mit P1 (Tab. A.5, Abb. A.3).

$\mu\text{g/ml}$	OX6	OX17	OX18	NDS61	JJ319	Mausserum
50	0,55 \pm 0,11	2,08 \pm 0,41	3,23 \pm 0,71	0,02 \pm 0,01	4,91 \pm 0,76	6,23 \pm 1,00
10	1,85 \pm 0,25	2,58 \pm 0,47	4,04 \pm 0,52	2,18 \pm 0,32	6,21 \pm 0,81	6,86 \pm 0,73
1	3,06 \pm 0,39	3,84 \pm 0,59	5,38 \pm 0,53	5,78 \pm 0,77	6,77 \pm 0,72	6,36 \pm 1,00
0,1	4,77 \pm 0,68	6,07 \pm 0,82	6,17 \pm 0,84	6,38 \pm 0,77	6,60 \pm 0,48	6,71 \pm 1,09
Ø	6,53 \pm 1,29					

Tabelle A.5: Mittelwerte und Standardabweichung (Stabw.) der Proliferation RT1.D2-spezifischer Lymphknotenzellen im T-Zell-Proliferationsassay nach Inhibition mit verschiedenen Antikörpern (jeweils drei Versuche). Ø = kein Antikörper.

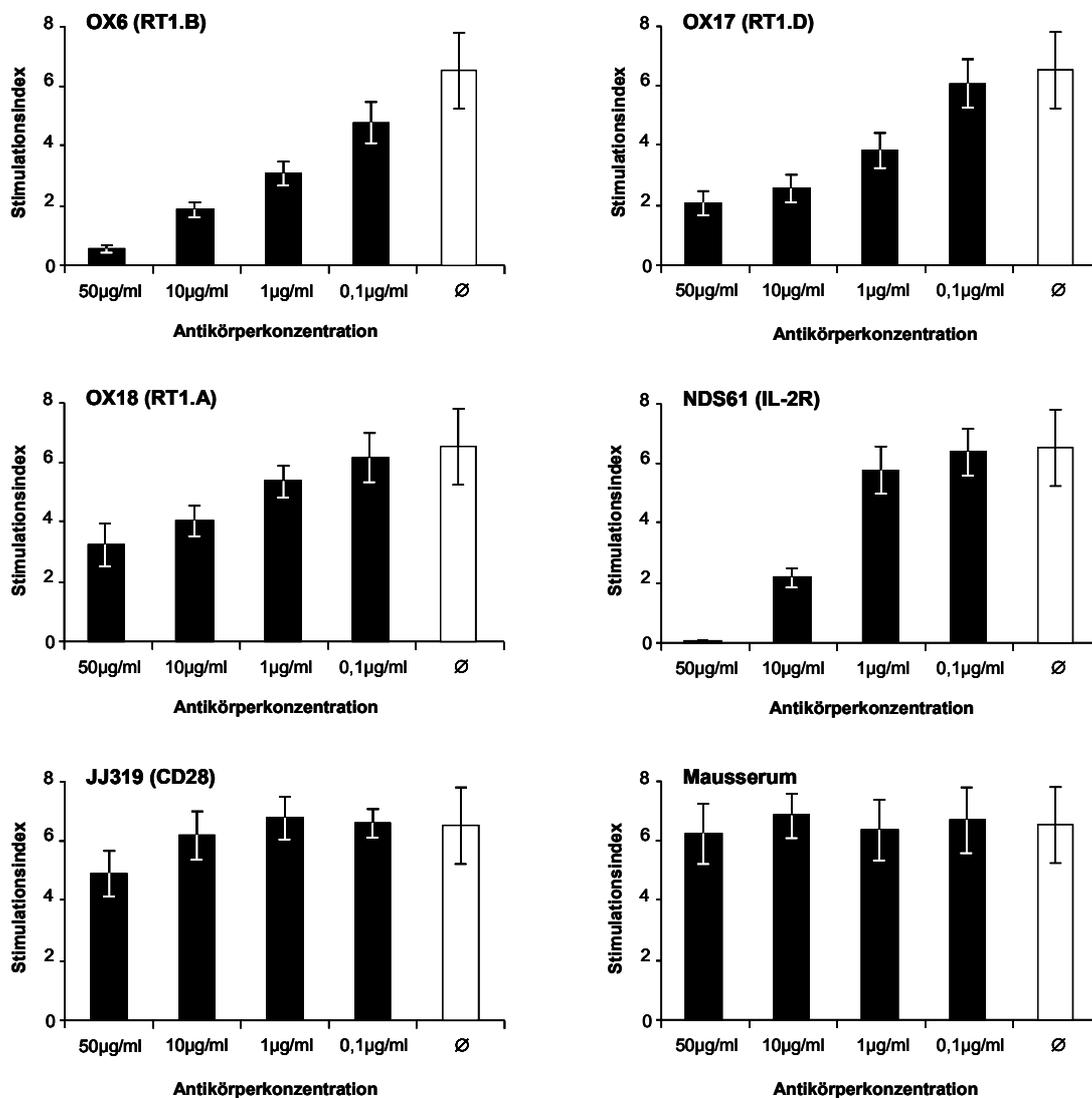


Abbildung A.3: Graphische Darstellung der Tab. A.5.

Durchflusszytometrische Analysen zur Vitalität der verwendeten Zellpopulationen: Nachfolgend sind Lebendfärbungen der für diese Arbeit wichtigsten Zellpopulationen angeführt. Die Färbungen wurden mit 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu 10 Minuten mit 7-AAD (5 µg für 5×10^5 Zellen) inkubiert.

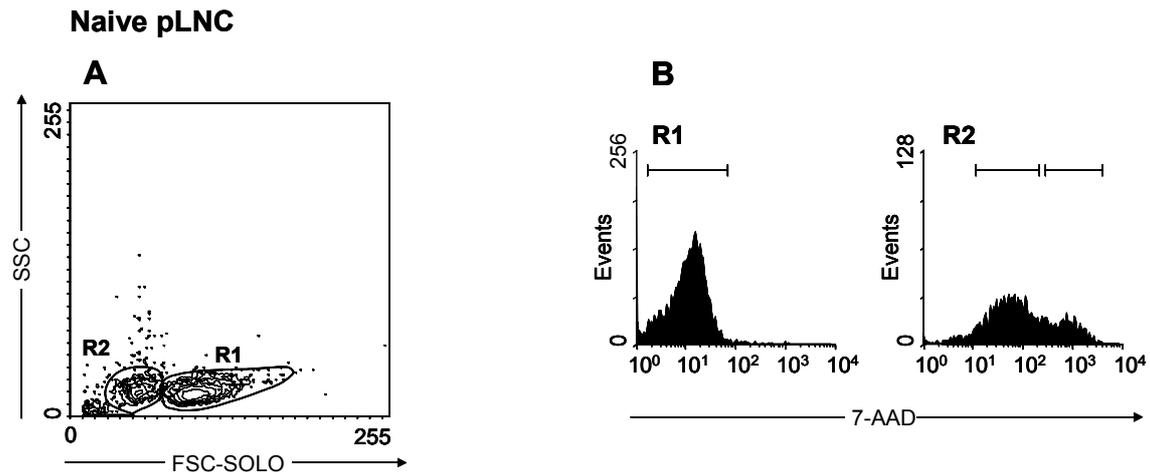


Abbildung A.4: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität naiver poplitealer Lymphknotenzellen. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

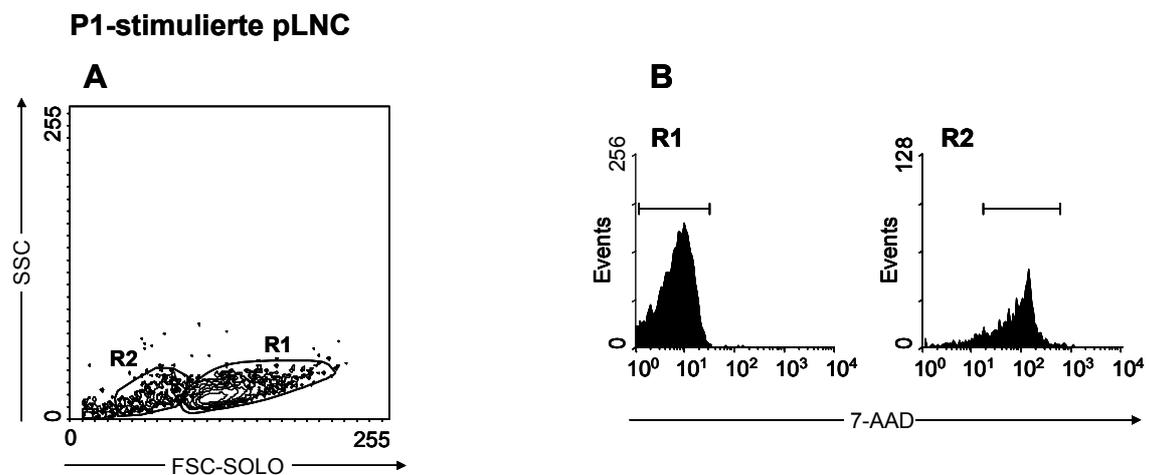


Abbildung A.5: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen. Repräsentative Darstellung aus zwölf Versuchen.

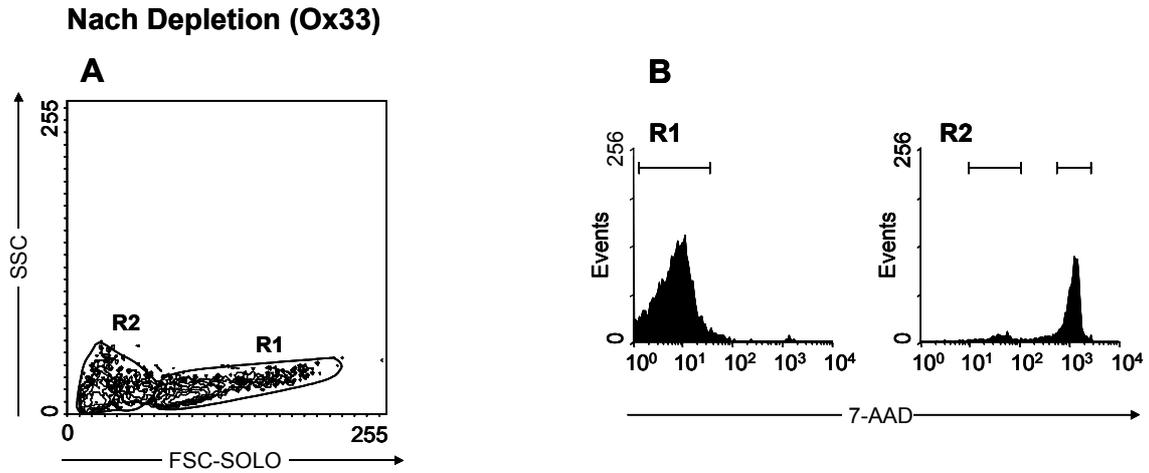


Abbildung A.6: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen nach Depletion der B-Lymphozyten mit dem Antikörper OX33. Repräsentative Darstellung aus drei Versuchen.

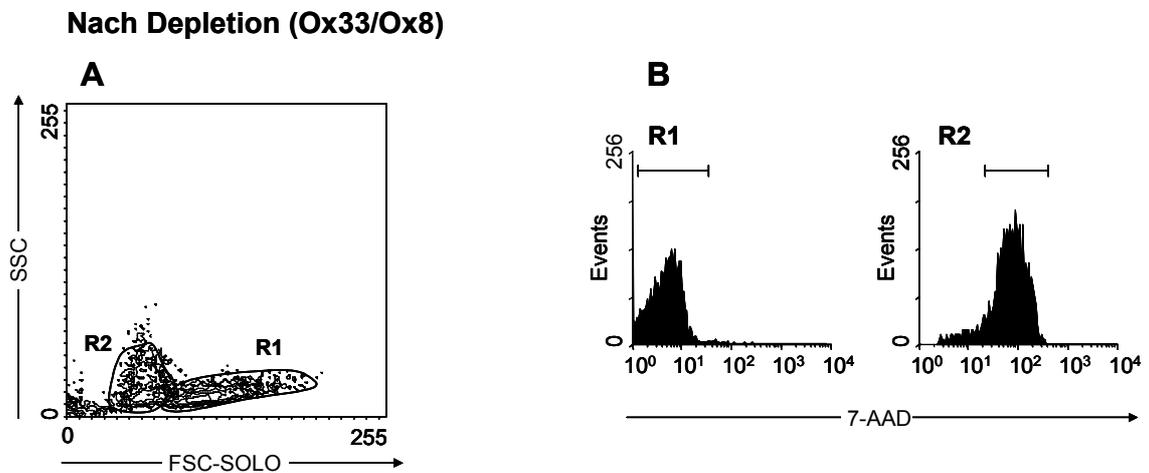


Abbildung A.7: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen nach Depletion der B-Lymphozyten und CD8⁺ T-Lymphozyten mit den Antikörpern OX33 und OX8. Repräsentative Darstellung aus vier Versuchen.

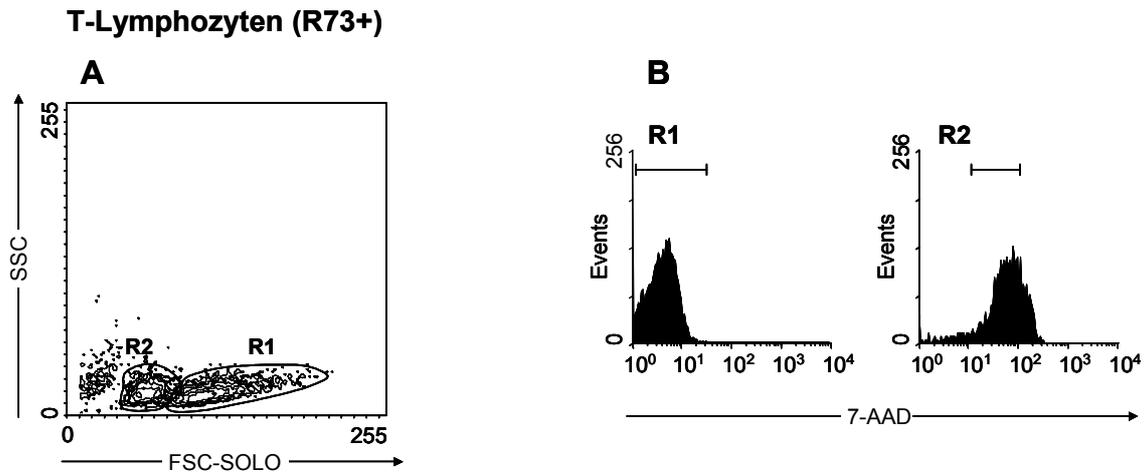


Abbildung A.8: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität R73-positiver P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen. Repräsentative Darstellung aus vier Versuchen.

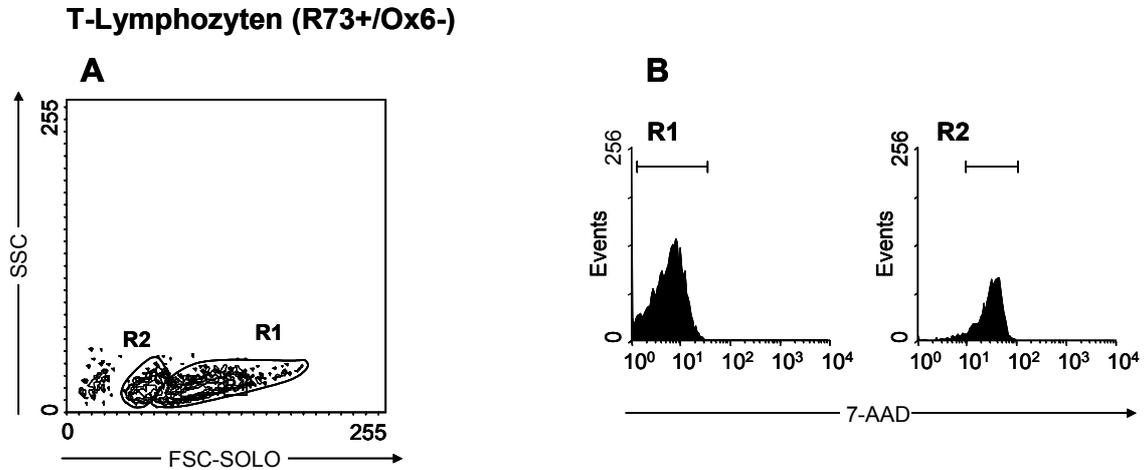


Abbildung A.9: Durchflusszytometrische Analyse der Vitalität R73-positiver P1-aktivierter poplitealer Lymphknotenzellen nach Depletion der MHC-Klasse-II-positiven Zellen (OX6). Repräsentative Darstellung aus zwei Versuchen.

Diese Arbeit wurde in Teilen publiziert:

Kongressbeitrag

Timmermann W, Sitaru S, Kottenmeier S, Gassel HJ, Ulrichs K, Otto C. Alloantigenspezifische Modulation der Immunantwort nach Transplantation: Immundominante Peptidanalogue als eine Strategie zur Immunmodulation. *Chirurgisches Forum* 2003; 32: 341-343

Kongressbeitrag und Poster

Otto C, Kottenmeier S, Sitaru G, Ulrichs K, Timmermann W. Die MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation alloreaktiver CD4+ T-Lymphozyten führt zur Immunaktivierung und Transplantatabstoßung. *Transplantationsmedizin* 2003 [Suppl] S. 81

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med A. Thiede und Frau Dr. rer. nat. K. Ulrichs danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Experimentellen Transplantationsimmunologie der Chirurgischen Universitätsklinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto für die Betreuung und hervorragenden Unterstützung bei der Fertigung dieser Arbeit. Die anregenden Diskussionen zu vielfältigen immunologischen Problemen, seine Geduld und seine moralische Unterstützung haben maßgeblich Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Frau N. Martens, Frau J. Grimmer, Frau N. Kehl, Frau B. Hein, Frau M. Schneider und Frau C. Seubert für ihre versierte technische Anleitung und sehr nette Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Kottenmeier
Geburtsdatum/-ort: 03.06.1977 in Würzburg
Anschrift: Wagnerstraße 12, 97080 Würzburg

Schulbildung

1984-1988 Grundschohle Hohenroth
1988-1997 Rhöngymnasium Bad Neustadt

Zivildienst

9/1997-10/1998 Sozialstation, Diakonisches Werk, Bad Neustadt

Hochschulausbildung

10/1998-04/2005 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

08/2000 Ärztliche Vorprüfung
08/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2001 Beginn der Dissertation an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg in der Abteilung für experimentelle Transplantationsimmunologie

03/2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2004-03/2005 Praktisches Jahr in Würzburg an der Missionsärztlichen Klinik und der neurochirurgischen Universitätsklinik

04/2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Würzburg, 14.Juli 2005

Stefan Kottenmeier
