

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

**Blockade der Antigenerkennung
als therapeutische Strategie in einem
CD8⁺ T-Zell vermittelten Mausmodell der
Multiplen Sklerose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Heike Carola Eujen
aus Heidelberg

Würzburg, Januar 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Korreferent: Prof. Dr. med. Heinz Wiendl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose	2
1.1.3	Histopathologische Einteilung der MS	5
1.1.4	Therapie der MS	5
1.1.4.1	Immuntherapie	5
1.1.4.2	Ausblick auf neue Therapeutika	7
1.2	CD8⁺ T-Zell vermittelte Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	8
1.2.1	CD4 ⁺ versus CD8 ⁺ medierte EAE	8
1.2.2	Rolle der CD8-positiven T-Zellen in der Pathogenese der MS	9
1.2.3	Spontane Entwicklung einer CD8 ⁺ T-Zell vermittelten EAE in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen	10
1.2.4	Charakterisierung der CD8 ⁺ T-Zell vermittelten EAE bei ODC-OVA/OT-I Mäusen	11
1.2.4.1	Die OT-I medierte EAE ist unabhängig von CD4 ⁺ T-Lymphozyten und B-Zellen	11
1.2.4.2	Entzündung und Demyelinisierung im Zentralnervensystem doppelt transgener Mäuse	12
1.2.4.3	Der Zugang von OT-I Zellen zu SIINFEKL:H-2K ^b Komplexen auf Oligodendrozyten ist auf die ersten 10 Lebensstage beschränkt	12
1.2.4.4	Rolle des von OT-I Zellen produzierten Interferon- γ	13
1.3	Der monoklonale Antikörper 25-D1.16	14
1.3.1	Sensitivität und Spezifität	14
1.3.2	Affinität von 25-D1.16 zu SIINFEKL:H-2K ^b Komplexen	14
1.3.3	Lokalisation der Bindungsstellen von 25-D1.16 bzw. OT-I T-Zell Rezeptor am SIINFEKL:MHC-I Komplex	15
1.3.4	Einsatz des Antikörpers 25-D1.16	17
1.4	Ziele dieser Arbeit	17
2	MATERIAL	18
3	METHODEN	29
3.1	Aufreinigung des Antikörpers 25-D1.16	29
3.1.1	Proteinextraktion	29
3.1.2	Affinitätschromatographie	29
3.1.3	Proteinbestimmung	30

3.1.4	Konzentrierung des Antikörpers mittels Ultrafiltrationsmembran und Pufferwechsel	30
3.1.5	Reinheitskontrolle mittels SDS-Page	30
3.1.5.1	Probenvorbereitung	30
3.1.5.2	Durchführung der Gelelektrophorese	31
3.1.5.3	Coomassie Färbung	32
3.2	Zellkultur	32
3.2.1	Erhaltungskultur	32
3.2.2	Einfrieren von Zellen	32
3.2.3	Auftauen von Zellen	32
3.3	Präparation von Lymphozyten aus verschiedenen Geweben transgener Mäuse	33
3.3.1	Aufbereitung der Organe	33
3.3.2	Hämolyse	33
3.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	33
3.4	Durchflusszytometrie im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)	34
3.4.1	Oberflächenfärbungen	34
3.4.2	Messung und Analyse	36
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	36
3.6	Magnetische Zellseparation (MACS)	37
3.6.1	CD8 ⁺ T-Zell Aufreinigung aus OT-I transgenen Mäusen	38
3.6.2	Kontrolle des Reinheitsgrades der Zellseparation	39
3.7	Radioaktiver Proliferationsassay	39
3.7.1	Festlegung der SIINFEKL-Konzentration für die OT-I Zell-Stimulation	39
3.7.2	Zytostatische Behandlung / Bestrahlung Antigen-präsentierender Zellen zur Hemmung ihrer Proliferation	40
3.7.3	Durchführung der Proliferationsassays	40
3.7.4	Auswertung mittels automatisiertem Harvester	41
3.8	IFN-γ-ELISA	41
3.9	Versuche mit OT-I und ODC-OVA transgenen und ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen	42
3.9.1	Haltung transgener Mäuse	42
3.9.2	Antikörper-Gabe in vivo	42
3.9.3	Gewebeentnahme und Fixierung	43
3.9.4	Einbettung in Paraffin	43
3.9.5	Herstellung der Gewebeschnitte und Beschichten von Objektträgern	44
3.9.6	Histologie der Gehirn- und Rückenmarksschnitte	44
3.9.6.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	44

3.9.6.2	Immunhistochemische Färbungen (CD3, Mac-3)	45
3.9.6.3	Luxol Fast Blue- und PAS-Färbung	46
3.10	Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR	47
3.10.1	Präparation genomischer DNA	47
3.10.2	Amplifikation der DNA mittels PCR	47
3.10.3	Auftrennung der DNA mit Agarose-Gel-Elektrophorese	48
3.11	Statistische Auswertung der Ergebnisse	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Isolierung des monoklonalen Antikörpers 25-D1.16 aus Kulturüberstand	50
4.2	Nachweis der Erkennung des Octapeptid-MHC-I Komplexes durch 25-D1.16 mittels FACS-Analyse und fluoreszenz-mikroskopischer Analyse	51
4.2.1	FACS-Analyse	51
4.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	53
4.3	Interferenz des Antikörpers 25-D1.16 mit der durch exogen zugeführtes SIINFEKL initiierten Aktivierung von OT-I Zellen	54
4.3.1	Expression von Aktivierungsmarkern durch SIINFEKL-stimulierte OT-I Zellen	55
4.3.2	Proliferation Peptid-stimulierter OT-I Zellen in Anwesenheit des Antikörpers 25-D1.16	56
4.3.3	Zytokinausschüttung durch OT-I Zellen in Gegenwart von SIINFEKL und 25-D1.16	59
4.4	Erkennung des Octapeptid-MHC-I Komplexes durch 25-D1.16 auf Ovalbumin-synthetisierenden Zellen	60
4.5	Interferenz von 25-D1.16 mit der Aktivierung von OT-I Zellen durch von EG.7-OVA Zellen endogen produziertes und präsentierte SIINFEKL	62
4.5.1	Einfluss des Antikörpers 25-D1.16 auf die CD69 Expression von SIINFEKL-stimulierten OT-I Zellen	62
4.5.2	Proliferation von OT-I Zellen in Gegenwart von 25-D1.16 bei Präsentation von SIINFEKL durch EG.7-OVA Zellen	64
4.5.3	IFN- γ -Produktion von OT-I Zellen in Gegenwart von 25-D1.16 bei Präsentation von SIINFEKL durch EG.7-OVA	66
4.6	Therapeutischer Nutzen des Antikörpers 25-D1.16 im ODC-OVA/OT-I Tiermodell in vivo	68
4.6.1	Evaluierung der klinischen Ausprägung der EAE	68
4.6.2	Phäno- und Genotypisierung	69
4.6.3	Histologie	70

4.6.4	Therapie der CD8 ⁺ T-Zell vermittelten EAE mit dem monoklonalen Antikörper 25-D1.16	72
4.6.4.1	Krankheitsverlauf	72
4.6.4.2	Wachstumskurven von mit 500 µg 25-D1.16 behandelten doppelt transgenen Mäusen	75
4.6.4.3	Histopathologie der mit 25-D1.16 behandelten ODC-OVA/OT-I Mäuse	76
4.6.4.4	Nachbeobachtung von erfolgreich therapierten doppelt transgenen Mäusen	79
4.6.4.5	Effekt der Therapie mit 200 und 500 µg 25-D1.16 auf die Entwicklung OVA-spezifischer T-Zellen in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen	79
4.7	Zusammenfassung der Therapie der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE mit 25-D1.16	81
5	DISKUSSION	83
5.1	Blockade der Antigenerkennung der OT-I Zellen durch den Antikörper 25-D1.16 in vitro	83
5.2	Effekt von 25-D1.16 in der CD8⁺ T-Zell medierten EAE bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen	85
5.3	Vorschläge für zukünftige Experimente mit 25-D1.16	86
5.4	Monoklonale Antikörper mit Spezifität für Peptid:MHC-Klasse-II Komplexe	87
5.5	Immunmodulation durch Peptid:MHC-Klasse-II spezifische Antikörper in einem CD4⁺ T-Zell vermittelten EAE-Modell	89
5.6	Weitere Möglichkeiten der Interferenz mit der Antigenerkennung in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen	90
5.7	Regulatorische vs. Pathogene Funktion der CD8⁺ T-Zellen in EAE und MS	92
5.7.1	CD8 ⁺ T-Zellen als Suppressor-Zellen in der EAE	93
5.7.2	CD8 ⁺ T-Suppressor-Zellen bei Multipler Sklerose	94
5.7.3	Pathogene Funktion von CD8 ⁺ T-Zellen in EAE-Modellen	94
5.7.4	Pathogenität der CD8 ⁺ T-Zellen bei Multipler Sklerose	95
5.8	Die EAE als Modell der Multiplen Sklerose	97
5.9	Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen	98

6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	103
8	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	105
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata (ED) genannt, ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) mit unterschiedlicher Ausprägung von Demyelinisierung und axonalem Schaden, die bereits im jungen Erwachsenenalter zu persistierender Behinderung führt.

Die MS ist eine multiphasische Erkrankung (Steinman, 2001). Klinisch beginnt sie bei ca. 85% der Patienten mit einem schubförmigen Verlauf und Perioden relativer klinischer Stabilität zwischen den Schüben. Frühsymptome sind häufig die einseitige Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen oder eine belastungsabhängige Schwäche der Beine (Weinshenker, 1998). Ohne Therapie liegt die Schubrate anfangs bei durchschnittlich 1,8 Schüben/Jahr und nimmt in den folgenden Jahren kontinuierlich ab (Weinshenker and Ebers, 1987). Bei 50% der Patienten kommt es innerhalb von 10 Jahren zum Übergang in eine progrediente Verlaufsform (sekundäre Progredienz).

Neben dem schubförmigen Verlauf gibt es einen primär progredienten Verlauf, bei dem keine einzelnen Schübe abgrenzbar sind, sondern die Krankheit von Beginn an stetig fortschreitet. Es findet sich dann häufig eine über Jahre zunehmende spastische Gangstörung, seltener auch ein progredientes zerebelläres Syndrom (Thompson et al., 2000).

Frauen erkranken doppelt so häufig an der schubweisen Verlaufsform wie Männer, aber gleichhäufig an der chronisch progredienten Form der MS.

Um die Diagnose möglichst früh im Erkrankungsverlauf zu sichern, haben sich im klinischen Alltag in den letzten Jahren die McDonald-Kriterien (McDonald et al., 2001) mit Fokussierung auf den schnellstmöglichen bildmorphologischen oder klinischen Nachweis der räumlichen und zeitlichen Dissemination der Erkrankung etabliert.

Weltweit sind über 1 Mio. Menschen betroffen, in Deutschland wird die Prävalenz auf 30-60 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Hein and Hopfenmuller, 2000).

Die sozio-ökonomischen Auswirkungen der MS sind enorm. Unter Berücksichtigung auch der indirekten Kosten (Produktivitätsverlust durch Arbeitsunfähigkeit, Frühberentung) betragen die Krankheitskosten bundesweit jährlich 4 Mrd. Euro (Kobelt et al., 2006).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die genauen Ursachen der MS sind auch heute noch unbekannt. Es herrscht jedoch Übereinstimmung dahingehend, dass die MS eine Autoimmunerkrankung ist.

Es wird davon ausgegangen, dass sich die MS in genetisch prädisponierten Individuen entwickelt. Am Besten gesichert ist die Assoziation mit HLA-DR2 (Haines et al., 1996). HLA-DR2 positive Individuen tragen ein 3-4 fach erhöhtes Risiko, an MS zu erkranken.

Auch Umweltfaktoren spielen eine Rolle. Die Prävalenz variiert zwischen 50-100 pro 100.000 Einwohner in Hochrisiko-Regionen (USA und Nordeuropa) und weniger als 5 pro 100.000 in Japan und Afrika.

Bei der MS geht die immunologische Toleranz gegen körpereigenes Gewebe im ZNS verloren. Demnach ist eine durch Umweltfaktoren und genetische Prädisposition getriggerte Fehlfunktion des Immunsystems entscheidend für die Krankheitsentstehung (Noseworthy et al., 2000).

Zunächst kommt es durch autoimmun-entzündliche Prozesse zu einer Demyelinisierung von Axonen. Nach mehreren Jahren schließt sich eine neurodegenerative Phase an, die zu irreversiblen Verlust von Axonen und Neuronen führt und mit bleibenden neurologischen Defiziten einhergeht (Steinman, 2001). Im Unterschied zu neurodegenerativen Erkrankungen ist der Nervenzellverlust bei der MS entzündlich bedingt (Lassmann et al., 2001; Peterson et al., 2001), was eindeutig eine immunmodulierende Therapie in der Frühphase der Multiplen Sklerose rechtfertigt (siehe Kapitel 1.1.4.1).

Zu Beginn der Erkrankung werden autoreaktive T-Lymphozyten in der Peripherie des Körpers aktiviert. Ursache der Entstehung dieser autoreaktiven T-Zellen ist wahrscheinlich der Mechanismus des molekularen Mimikry, bei dem exogene

Epitope (z.B. von Bakterien oder Viren) körpereigenen Epitopen ähneln und eine Kreuzreaktion hervorrufen (Benoist and Mathis, 2001). Kürzlich gelang es Cepok et al. bestimmte Epitope des Epstein-Barr-Virus (EBV) als mögliche Zielstrukturen der humoralen Immunantwort, sowie EBV-spezifischer, kreuzreaktiver CD8⁺ T-Zell Klone bei MS-Patienten zu identifizieren (Cepok et al., 2005). Mit diesen Beobachtungen stimmt eine Reihe von Berichten über einen möglichen kausalen Zusammenhang von vorangegangenen EBV-Infektionen mit der Entstehung einer MS überein (DeLorenze et al., 2006). Des Weiteren haben das Herpesvirus 6, Masern- und Papillomaviren Sequenzen mit dem basischen Myelinprotein, einem der Haupt-Autoantigene der MS, gemein (Zamvil and Steinman, 2003).

Nach der Aktivierung der T-Zellen erfolgt die Penetration der Blut-Hirn-Schranke mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Faktoren und migrationsfördernden Substanzen (Engelhardt and Ransohoff, 2005). Im ZNS kommt es zu einer polyklonalen Proliferation der autoreaktiven Zellen, die nach erneuter Aktivierung durch Mikrogliazellen bestimmte Strukturen des ZNS „irrtümlich“ als Antigene erkennen.

CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helfer-Zellen) und CD8⁺ T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) setzen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon- γ (IFN- γ) frei. Dies führt entweder direkt oder indirekt über die Anlockung von Makrophagen zur Zerstörung der Myelinscheide. Zur Rolle der CD8⁺ T-Lymphozyten siehe auch Kap. 1.2.2.

Ferner werden durch T-Zellen B-Zellen aktiviert, die spezifische Antikörper (Autoantikörper) produzieren, welche über Aktivierung des Komplementsystems ebenfalls zu Schäden der Myelinscheide führen (Archelos and Hartung, 2000). Die pathogenetische Bedeutung der gegen Komponenten der Myelinscheide gerichteten Antikörper (Anti-basisches Myelinprotein [MBP], Anti-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein [MOG], Anti-Myelin-assoziiertes Glykoprotein [MAG], Anti-Proteolipoprotein [PLP]) in Bezug auf Ausmaß und Schwere der Gewebsschädigung ist inzwischen durch verschiedene experimentelle Studien belegt. Die genaue Relevanz dieser Antikörper beim Menschen und vor allem deren prognostische Aussagekraft ist jedoch noch widersprüchlich (Aboul-Enein et al., 2004; Antel and Bar-Or, 2003; Cleland et al., 2005; Lim et al., 2005).

Durch die Demyelinisierung der Axone und das entzündliche Milieu kommt es zu axonalen Transportstörungen, vermehrter Expression von exzitatorischen Ionenkanälen auf der Oberfläche, sowie mitochondrialen Funktionsstörungen, die ebenfalls die axonale Degeneration fördern (Rieckmann and Maurer, 2002). Ein weiterer Pathomechanismus, der diskutiert wird, führt durch gestörte Apoptose zu einer Vermehrung autoreaktiver T-Zellen in Blut und ZNS (Zipp et al., 1997).

Außerdem hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass die Funktionsstörung regulatorischer T-Zellen, deren Aufgabe es ist, autoreaktive Prozesse zu unterdrücken, möglicherweise eine wesentliche Rolle bei der Multiplen Sklerose spielt (Sakaguchi, 2005).

Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligten Komponenten des Immunsystems.

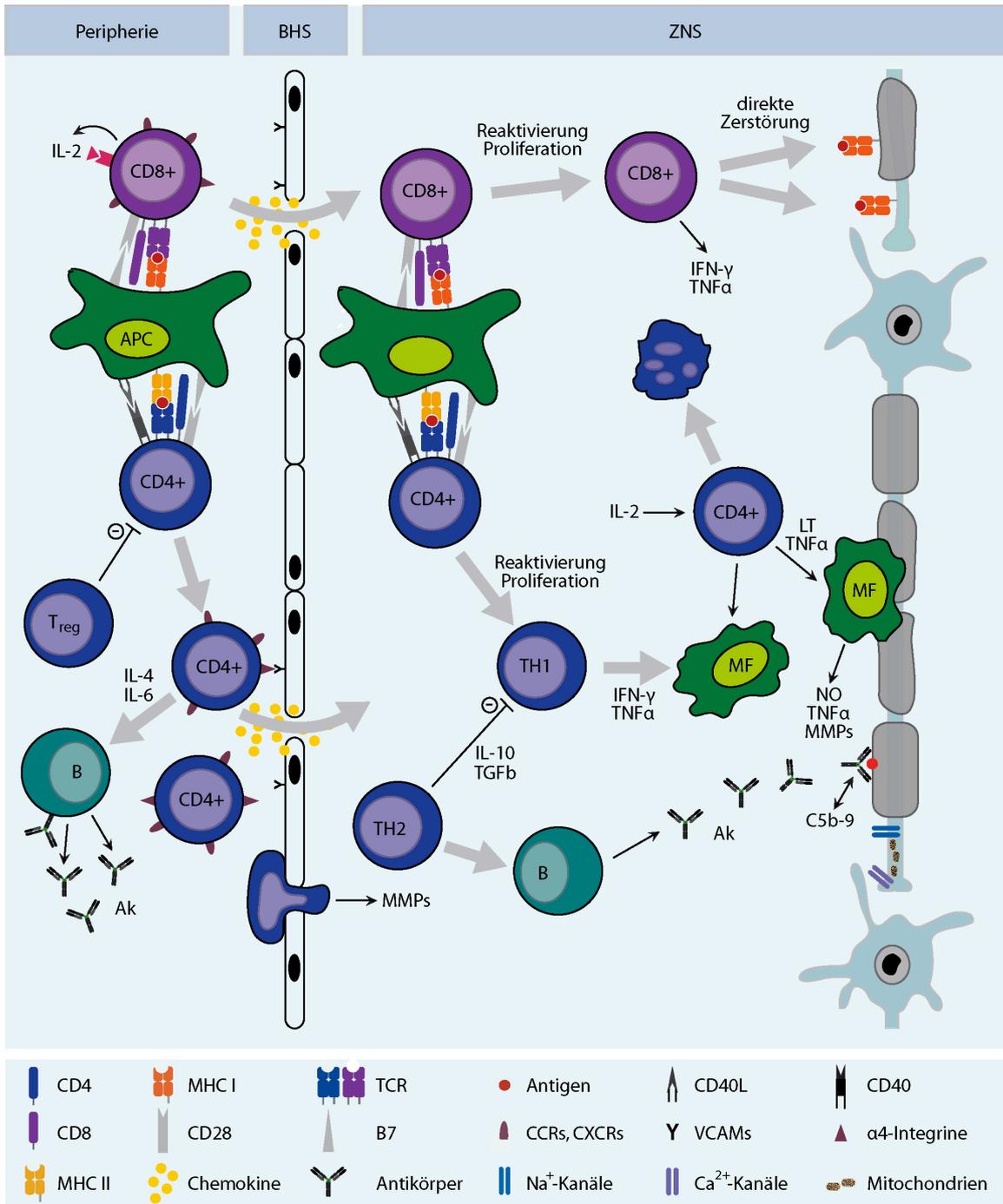


Abb. 1.1 Übersicht über die bei der Multiplen Sklerose pathogenetisch beteiligten Elemente des Immunsystems.
Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung: Zunächst kommt es außerhalb des ZNS zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (CD4+/CD8+) durch spezifische Antigene. Voraussetzung für deren Erkennung ist eine Interaktion des T-Zell Rezeptors (TCR) mit dem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) dargebotenen Komplex aus MHC-Molekül (MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex) und Antigen in Anwesenheit co-stimulatorischer Moleküle (CD28, B7, CD40, CD40L). Aktivierte CD8+ T-Lymphozyten produzieren IL-2 zur autokrinen Stimulation.
Chemotaxis, Adhäsion und Migration: Die aktivierten T-Zellen besitzen die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu passieren. Die Regulation dieses Migrationsvorganges unterliegt einem komplexen Zusammenspiel aus Adhäsionsmolekülen wie dem Liganden-Paar α4-Integrin/VCAM, Chemokinen und Chemokinrezeptoren (CCRs, CXCRs). Auch Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind hieran beteiligt.
Zerstörung von Gliazellen und Neuronen durch zytotoxische T-Zellen: Oligodendrozyten und Neurone exprimieren die für die Interaktion mit CD8+ T-Lymphozyten nötigen MHC-I-Moleküle. Nach Erkennung des Autoantigens erfolgt die direkte Zerstörung der Zellen durch Attacke der zytotoxischen T-Lymphozyten.

Makrophagen-Aktivierung und Demyelinisierung: Nach Passage der Blut-Hirn-Schranke findet durch Interaktion mit lokalen APCs eine Reaktivierung statt. Dies führt über die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ zur Rekrutierung und Stimulation von Mikroglia und Makrophagen. Diese Zellen steigern wiederum die Phagozytose und stellen vermehrt Zytokine und freie Radikale her, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, Lymphotoxin (LT) und Stickstoffmonoxid (NO), die Demyelinisierung und Axonschädigung verursachen.

B-Zell Aktivierung und Bildung von Antikörpern: T-Zellen aktivieren über die Ausschüttung von IL-4 und IL-6 B-Zellen, die daraufhin autoreaktive Antikörper sezernieren. Außerdem sind sie in der Lage die Komplement-Kaskade zu aktivieren. Nach Opsonisierung durch die autoreaktiven Antikörper werden die Zielzellen durch Ausbildung von Membranangriffskomplexen (C5b-9) zerstört.

Axonale Degeneration: Die axonale Degeneration liegt darüber hinaus in der Hochregulation von Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen, sowie mitochondrialen Funktionsstörungen begründet. Ein Wechselspiel pro- und antiinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-10, $\text{TGF}\beta$ und IL-2, bestimmt das Ausmaß der Entzündungsreaktion. Bestimmte Zytokine (v.a. IL-2) können außerdem die Apoptose von T-Zellen induzieren.

Zeichnung in Anlehnung an (Kleinschnitz et al., 2007).

1.1.3 Histopathologische Einteilung der MS

In den morphologisch heterogenen Läsionen einer akuten MS lassen sich mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden vier verschiedene immunpathogenetische Subtypen unterscheiden (Lucchinetti et al., 2000): Subtyp I: Makrophagen-/T-Zell-mediert; Subtyp II: Antikörper-/Komplement-mediert; Subtyp III: Oligodendrozytenapoptose, Verlust von myelinassoziertem Glykoprotein (MAG), Hypoxiezeichen (Aboul-Enein et al., 2003) und Subtyp IV: Untergang von Oligodendrozyten in der periläsionalen weißen Substanz (Lassmann et al., 2001). Hierbei wird also zwischen primär immunologisch induzierter Entmarkung (Subtyp I und II) und Störung des Oligodendrozytenstoffwechsels (Subtyp III und IV) unterschieden.

Die Mechanismen der Gewebeschädigung sind nicht nur interindividuell variabel, sondern auch bei ein und demselben Patienten abhängig vom Stadium der Erkrankung (schubförmige MS oder primäre/sekundäre Progredienz) (Lassmann et al., 2001).

Am häufigsten treten die Subtypen I und II auf (80%). Sie zeigen große Ähnlichkeit mit T-Zell- oder T-Zell-/Antikörper-medierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitiden (EAE) der Maus bzw. Ratte, die deshalb anerkannte Tiermodelle der MS darstellen.

1.1.4 Therapie der MS

1.1.4.1 Immuntherapie

Standardtherapie des akuten MS-Schubes ist die Applikation von hoch dosierten Glukokortikosteroiden i.v. (Beck et al., 1992; Goodin et al., 2002; Grauer et al.,

2001; Kaufman et al., 2000; Oliveri et al., 1998). Bei einem klinisch schweren Schub, der nicht ausreichend auf Kortikosteroid-Pulstherapien anspricht, zeigte die Therapie mit Plasmapherese eine 50 %ige Erfolgschance (Weinshenker et al., 1999).

Als Basistherapie zur Schubprophylaxe kommen rekombinante IFN- β -Präparate und Glatirameracetat zum Einsatz. Während Glatirameracetat (synthetisches Polypeptid mit Homologien zu MBP) im Allgemeinen gut verträglich ist, treten bei den Interferonpräparaten häufig grippeähnliche Nebenwirkungen auf, die einen wesentlichen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten und deren Compliance haben können. In letzter Zeit wurde die Aufmerksamkeit auch vermehrt auf die Induktion von neutralisierenden Antikörpern (NAB) gegen das Interferon gelenkt, da die Frequenz der Schübe bei Patienten mit hohen NAB-Titern wieder erhöht ist (Sorensen et al., 2003) und das Risiko eines Therapieversagens bei anhaltend hohen NAB-Titern statistisch ansteigt.

Der kürzlich unter dem Handelsnamen Tysabri® als Monotherapie zur Behandlung schubförmiger MS-Formen zugelassene humanisierte, monoklonale Antikörper Natalizumab ist gegen das Adhäsionsmolekül $\alpha 4\beta 1$ -Integrin (VLA-4) auf der Oberfläche von Lymphozyten gerichtet. Durch die Hemmung der Interaktion zwischen $\alpha 4\beta 1$ -Integrin und dessen Liganden VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) auf dem Gehirndothel verringert er die Migration von Leukozyten in das ZNS (Steinman, 2005). Die Wirksamkeit von Natalizumab wurde in Studien ebenfalls durch eine deutliche Schubreduktion belegt (Polman et al., 2006). Als unerwünschte Wirkung können jedoch schwere allergische Reaktionen auftreten. Außerdem wurden bis Januar 2010 über 30 Fälle von PML (progressive multifokale Leukenzephalopathie) unter Natalizumab-Therapie registriert.

Als Reservepräparate in der Basistherapie der schubförmigen MS bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen stehen Azathioprin und intravenös verabreichte Immunglobuline (IVIg) zur Verfügung.

Die Gabe von Mitoxantron in der eskalierenden Langzeittherapie bei Versagen der Basistherapie mit hoher Schubfrequenz bzw. sekundär progredientem Verlauf hat sich zwar seit Jahren bewährt (Hartung et al., 2002), ist aber limitiert

v.a. durch die Kardiotoxizität dieses Medikaments und eine damit einhergehende Begrenzung der kumulativen Lebenszeitdosis.

Bei sekundär-chronischer schnell progredienter MS ist die Gabe des immunsuppressiv wirkenden Alkylanz Cyclophosphamid indiziert.

Abbildung 1.2 zeigt die immunmodulatorische Stufentherapie der Multiplen Sklerose.

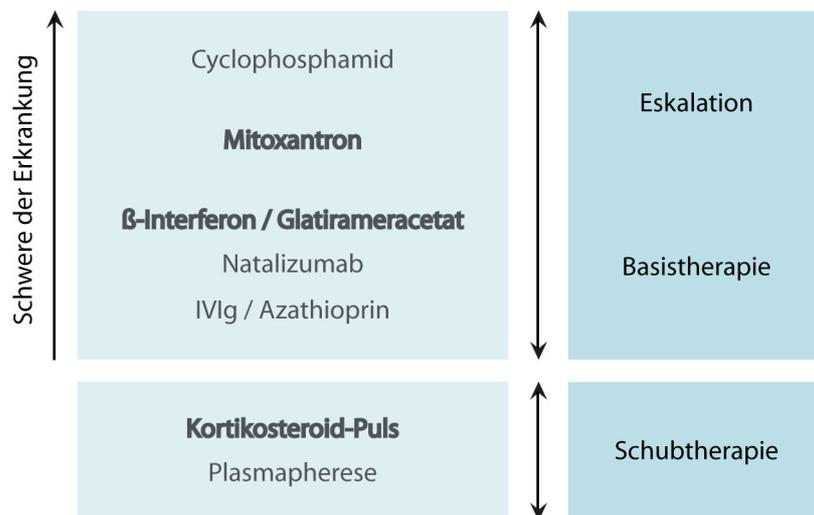


Abb. 1.2 Immunmodulatorische Stufentherapie der MS. Als Therapien des akuten Schubes werden hochdosierte Kortikosteroide und Plasmapherese eingesetzt. Als Basistherapie haben sich β -Interferone und Glatirameracetat etabliert, als Alternativen stehen Natalizumab, intravenöse Immunglobuline (IVIg) und Azathioprin zur Verfügung. In der Eskalationstherapie kann Mitoxantron verabreicht werden. Bei schnell progredienten, chronischen Verläufen ist die Gabe von Cyclophosphamid indiziert. Die Medikamente der ersten Wahl sind jeweils fett gedruckt. Zeichnung modifiziert nach H.C. Diener u.a.

1.1.4.2 Ausblick auf neue Therapeutika

Durch das zunehmende Verständnis der Immunpathogenese der MS wird derzeit eine große Zahl neuer Medikamente gegen die Erkrankung entwickelt und in Studien getestet.

Vielversprechende neue Optionen könnten der monoklonale Antikörper Rituximab, der gegen das CD20-Molekül auf B-Zellen gerichtet ist (Antel and Bar-Or, 2003; Cree et al., 2005; Hauser et al., 2008; Matiello et al., 2007), und die monoklonalen Antikörper Alemtuzumab (gegen das Leukozyten-Differenzierungsmolekül CD52) (Jones and Coles, 2008) und Daclizumab (Blockade des Interleukin-2-Rezeptors) (Bielekova et al., 2004; Martin, 2008; Rose et al., 2007) sein. Es wurde in den Studien jedoch bereits deutlich, dass

diese effektiven Medikamente auch unerwartete und zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich bringen.

Unter den oralen Präparaten sind FTY720/Fingolimod (Kompartimentalisierung der Lymphozyten) (Kappos et al., 2006), Fumarsäure (entzündungshemmende, evtl. auch neuroprotektive Wirkung) (Kappos et al., 2006; Schimrigk et al., 2006), Laquinimod (immunmodulatorische Wirkung) (Polman et al., 2005), Teriflunomid (Blockade des Mitochondrienenzym Dihydrorotatdehydrogenase, Hemmung der B- und T-Zell Proliferation) (O'Connor et al., 2006) und Cladribin (selektiv lymphotoxische Wirkung) (Romine et al., 1999) zu nennen, die in Zulassungsstudien getestet werden.

Für die schubförmige MS hat sich das therapeutische Spektrum also im letzten Jahrzehnt deutlich vergrößert und wird sich auch in Zukunft noch erweitern. Während die positive Wirkung der bereits zugelassenen immunmodulierenden Substanzen auf Schubrate und magnetresonanztomographisch nachweisbare Krankheitsaktivität unbestritten ist, ist ihre Wirksamkeit hinsichtlich Krankheitsprogression und dauerhafter Behinderung unzureichend. In Anbetracht dessen geht die Suche nach alternativen Behandlungsstrategien weiter.

1.2 CD8⁺ T-Zell vermittelte Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

1.2.1 CD4⁺ versus CD8⁺ T-Zell medierte EAE

Das Maus-Modell der Multiplen Sklerose, die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) kann viele klinische, neuropathologische und immunologische Aspekte der Erkrankung nachbilden (Babbe et al., 2000). Die EAE wird klassischerweise durch Injektion von Gewebe des ZNS, insbesondere von basischem Myelinprotein (MBP), Proteolipoprotein (PLP) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) mit vollständigem Freundschens Adjuvans induziert. Dies führt zu einer Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten und zur Bildung von Autoantikörpern gegen diese Strukturen.

Während durch die CD4⁺ T-Zell vermittelten EAE-Modelle wichtige Erkenntnisse über Entzündungsprozess und autoimmune Gewebeerstörung gewonnen

wurden, war die Übertragung der im Modell gewonnenen Kenntnisse und die Testung therapeutischer Substanzen an MS-Patienten nur zum Teil erfolgreich (Gold et al., 2006).

Eine Erklärung hierfür ist, dass der entscheidenden Rolle der zytotoxischen T-Zellen bei der Entstehung einer MS in diesen CD4⁺ T-Zell-lastigen Tiermodellen nicht ausreichend Rechnung getragen wird.

Deswegen wurden inzwischen einige Maus-Modelle der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE entwickelt (Huseby et al., 2001; Sun et al., 1988; Sun et al., 2001; Sun et al., 2003), um die Bedeutung der zytotoxischen T-Lymphozyten bei der Zerstörung des ZNS durch autoimmune Mechanismen untersuchen zu können.

1.2.2 Rolle der CD8-positiven T-Zellen in der Pathogenese der MS

Die jüngsten Ergebnisse verschiedener Forschergruppen legen nahe, dass neben den klassischen CD4⁺ T-Zellen auch den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen eine große Bedeutung bei der Entstehung der Multiplen Sklerose zukommt (Friese and Fugger, 2005; Neumann et al., 2002).

In MS-Läsionen wurden klonal expandierte CD8⁺ T-Lymphozyten gefunden, wahrscheinlich als Zeichen einer Antigen-spezifischen Aktivierung. Es stammten sogar fast 30% aller T-Zellen einer MS-Läsion von einer einzigen CD8-positiven Zelle ab (Babbe et al., 2000). In Ergänzung hierzu konnten expandierte, z.T. identische Klone von CD8⁺ T-Zellen auch in Blut, Gehirn und Liquor nachgewiesen werden, die über längere Zeiträume persistieren (Skulina et al., 2004), was ihre pathogenetische Relevanz unterstreicht. CD8⁺ T-Lymphozyten interagieren mit Peptiden, die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Diese sind in MS-Plaques nicht nur auf den Entzündungszellen, sondern auch auf Neuronen und Gliazellen überexprimiert (Hoftberger et al., 2004).

In aktiven MS-Läsionen finden sich die CD8⁺ T-Zellen, die Granzym B¹ als Zeichen ihrer zytotoxischen Aktivität exprimieren, in direkter Nachbarschaft zu Oligodendrozyten oder demyelinisierten und beschädigten Axonen (Neumann et

¹ Granzyme sind Serinproteasen, die von zytotoxischen T-Zellen erzeugt werden und beim Auslösen der Apoptose in der Zielzelle mitwirken.

al., 2002) und ihre Zahl übersteigt die der CD4⁺ T-Zellen deutlich (Babbe et al., 2000).

Einige Epitope, die von den klonal expandierten CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, sind bereits identifiziert. Hierzu zählen verschiedene Peptide des MBP, PLP, MAG, MOBP (myelin-associated oligodendrocyte basic protein) (Crawford et al., 2004; Jurewicz et al., 1998; Zang et al., 2004) und das zytosolische Protein Transaldolase, ein Enzym, das an der Energieversorgung bei der Lipidbiosynthese während der Myelinisierung beteiligt ist (Niland et al., 2005). Oligodendrozyten exprimieren die für die Interaktion mit zytotoxischen T-Lymphozyten nötigen MHC-I-Proteine, wobei die Expression unter inflammatorischen Bedingungen noch gesteigert wird (Hoftberger et al., 2004). Es folgt wahrscheinlich eher eine direkte Zerstörung der Oligodendrozyten durch Attacke der zytotoxischen T-Zellen (Neumann et al., 2002) als eine indirekte Zerstörung durch Ausschüttung von Zytokinen und Mobilisierung von Makrophagen/Mikroglia.

1.2.3 Spontane Entwicklung einer CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen

Eines der neuesten Modelle einer CD8⁺ T-Zell medierten EAE sind ODC-OVA/OT-I doppelt transgene Mäuse. Dieses Modell einer sich spontan entfaltenden EAE wurde, wie die vorliegende Doktorarbeit, in der Arbeitsgruppe Prof. Hünig am Institut für Immunbiologie der Universität Würzburg entwickelt (Na et al., 2008). ODC-OVA transgene Mäuse (Cao et al., 2006) exprimieren das Modell-Autoantigen Ovalbumin (OVA) unter Kontrolle eines MBP-Promotors. Diesem Promotor fehlt eine upstream gelegene Enhancer-Sequenz, die essentiell ist für die Funktionalität des Promotors in Schwann-Zellen (Farhadi et al., 2003). OVA wird daher selektiv in Oligodendrozyten (ODC) exprimiert und konnte weder mit Western Blots noch mittels Immunhistochemie in anderen Organen außer Gehirn und Rückenmark nachgewiesen werden. Ohne Immunisierung zeigen ODC-OVA Mäuse keinerlei Anzeichen einer Krankheit, da T-Zellen und B-Zellen das Neo-Autoantigen nicht erkennen (Cao et al., 2006).

Abb. 1.3 zeigt das ODC-OVA Transgen-Konstrukt.



Abb. 1.3 Konstrukt des Transgens der ODC-OVA Mäuse. OVA wird in den Mäusen unter der Kontrolle eines Oligodendrozyten-spezifischen MBP-Promotors exprimiert. Vor und hinter das Transgen wurde eine loxP² Stelle gesetzt, um das Transgen durch Aktivierung eines induzierbaren Cre Transgens eliminieren zu können. Der Poly(A)-Schwanz ist notwendig für die Initiation der Translation.

Einkreuzen eines MHC-II restringierten OVA-spezifischen T-Zell Rezeptors oder der Transfer solcher OT-II transgenen CD4⁺ T-Zellen in ODC-OVA Mäuse führte nicht zu einer Aktivierung der T-Zellen oder Induktion einer EAE (Na et al., 2008).

OT-I Mäuse exprimieren auf den meisten ihrer CD8⁺ T-Zellen einen transgenen T-Zell Rezeptor, der spezifisch ist für das Peptid SIINFEKL (antigenes Epitop von Ovalbumin, der Name ist aus den Einzelbuchstaben-Abkürzungen der acht Aminosäuren zusammengesetzt) gebunden an das H-2K^b Molekül³ (Hogquist et al., 1994).

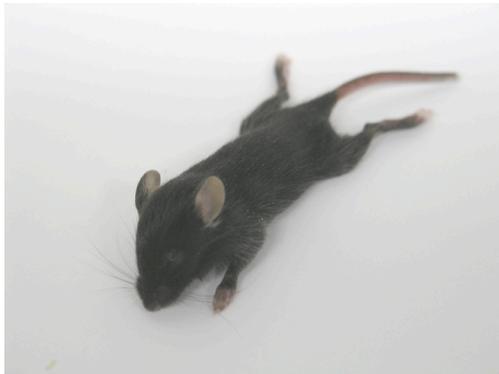
Kreuzt man ODC-OVA Mäuse mit diesen OT-I Mäusen, entwickeln doppelt transgene Nachkommen spontan eine fulminante EAE (Na et al., 2008).

Während die Jungtiere anfangs gesund erscheinen, zeigen sich zwischen Tag 12 und 19 nach Geburt bereits lokomotorische Defizite. Neben einer aufsteigenden Paralyse der Extremitäten, wie sie auch bei den klassischen CD4⁺ T-Zell vermittelten EAE-Modellen beobachtet wird, leiden ODC-OVA/OT-I Mäuse zudem an unkoordinierten Bewegungen der Vorder- und Hinterläufe, Gangataxie und einem ausgeprägten zerebellären Tremor – Symptome, die für eine Kleinhirnbeteiligung charakteristisch sind. Der Krankheitsverlauf führt innerhalb weniger Tage zu schwerster Behinderung mit Unfähigkeit zur Nahrungsaufnahme und dann zum Tod.

² Mit loxP wird eine bestimmte Basensequenz der DNA bezeichnet, welche als Erkennungssequenz für die Rekombinase cre fungiert. Soll aus einem DNA-Strang eine bestimmte DNA-Sequenz bzw. ein bestimmtes Gen entfernt werden, setzt man gezielt vor und hinter diesen DNA-Abschnitt eine loxP-Stelle. Das cre- Enzym erkennt und bindet die jeweiligen loxP-Stellen und schneidet die entsprechende DNA-Sequenz bzw. das Gen heraus. Die beiden verbleibenden loxP-Enden werden zusammengefügt. Damit ist das Marker-Gen eliminiert.

³ Bei Mäusen wird der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC = „major histocompatibility complex“) als H-2 bezeichnet. Die Organisation der MHC Gene ist bei Mensch und Maus ähnlich. H2-K entspricht dem menschlichen MHC-I-Molekül. Die Haptotypen werden durch hochgestellte Kleinbuchstaben, wie zum Beispiel H-2K^b, gekennzeichnet.

Abb. 1.4 zeigt doppelt transgene Mäuse, die an einer schweren EAE (Stadium 3 und 4) litten.



EAE-Stadium 3



EAE-Stadium 4

Abb. 1.4 ODC-OVA/OT-I Mäuse in fortgeschrittenem Krankheitsstadium. Doppelt transgene Tiere entwickeln eine fulminante EAE. Links ist eine Maus im EAE-Stadium 3 mit Paralyse des Schwanzes und beider Hinterläufe dargestellt. Das rechte Bild zeigt eine Maus im EAE-Stadium 4, die tetraplegisch war und einen starken zerebellären Tremor zeigte.

1.2.4 Charakterisierung der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE bei ODC-OVA/OT-I Mäusen

1.2.4.1 Die OT-I medierte EAE ist unabhängig von CD4⁺ T-Lymphozyten und B-Zellen

Führt man im Maus-Modell zusätzlich zu den beiden Transgenen ODC-OVA und OT-I eine Mutation in Form eines RAG-1⁴ Knockouts ein, erkrankten dennoch alle Tiere an einer schweren EAE. Die Bedeutung dieser Tatsache liegt darin, dass offensichtlich weder CD4⁺ T-Zellen, noch B-Zellen, noch CD8⁺ T-Zellen mit einer anderen Spezifität als die für den Komplex aus SIINFEKL und H-2K^b nötig sind, um eine letal verlaufende Autoimmunreaktion gegen das von Oligodendrozyten exprimierte Neo-Autoantigen auszulösen (Na et al., 2008).

1.2.4.2 Entzündung und Demyelinisierung im Zentralnervensystem ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Mäuse

Histopathologisch zeichnet sich die spontane CD8⁺ T-Zell vermittelte EAE durch extensive Destruktion des Kleinhirns, Hirnstammes, Nervus opticus und der

⁴ Die rekombinationsaktivierenden Gene RAG-1 und RAG-2 codieren die Proteine RAG-1 und RAG-2, die bei der Umordnung der Gene für die Immunrezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Mäuse, denen eines der Gene RAG-1 oder RAG-2 fehlt, können keine Immunrezeptoren bilden und besitzen keine Lymphozyten.

weißen Substanz des Rückenmarks aus. Es kommt zu spongiformer Zerstörung der Gewebsarchitektur, Infiltration von CD8-positiven T-Zellen (den OT-I Zellen), Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia und Demyelinisierung. Im Vergleich zum Gehirn schreiten diese Prozesse im Rückenmark noch schneller voran. Im Gegensatz zu klassischen CD4⁺ T-Zell mediierten EAE-Modellen scheinen die Axone zunächst erhalten und funktionstüchtig zu bleiben. Wie in menschlichen MS-Läsionen (Babbe et al., 2000; Crawford et al., 2004) finden sich in Kleinhirn und Rückenmark kranker ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Mäuse CD8⁺ T-Lymphozyten in direkter Nachbarschaft zu Oligodendrozyten. Sowohl infiltrierende OT-I Zellen als auch Makrophagen und Mikroglia zeigen Zeichen einer starken Aktivierung, wie etwa die Hochregulation von Aktivierungsmarkern im Falle der OT-I Zellen oder die vermehrte Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen und co-stimulatorischer Liganden im Falle der Makrophagen/Mikroglia.

1.2.4.3 Der Zugang von OT-I Zellen zu SIINFEKL:H-2K^b Komplexen auf Oligodendrozyten ist auf die ersten 10 Lebenstage beschränkt

Während sich durch einen Transfer von OT-I Zellen in 7-10 Tage alte ODC-OVA Mäuse eine EAE induzieren lässt, bleiben 12 Tage alte Mäuse nach einem solchen Zelltransfer gesund, obwohl ihre Oligodendrozyten weiterhin Ovalbumin exprimieren (Cao et al., 2006). Wahrscheinlich ist, dass die in den ersten Lebenstagen noch unvollständig entwickelte Blut-Hirn-Schranke ein Eindringen naiver OT-I Zellen in das ZNS ermöglicht. SIINFEKL wird ihnen dort über die auf Oligodendrozyten in geringer, jedoch ausreichender Dichte vorhandenen MHC-I-Moleküle präsentiert (Agresti et al., 1998). Das initiale Priming der OT-I Zellen findet also im Gehirn statt, durch Interaktion mit SIINFEKL:H-2K^b Komplexen trotz Abwesenheit co-stimulatorischer Liganden auf den Oligodendrozyten (Odeberg et al., 2005). Durch die Attacke der nun aktivierten OT-I Zellen wird Ovalbumin freigesetzt und im drainierenden Lymphgewebe von MHC-II positiven Zellen wie etwa dendritischen Zellen präsentiert. Dies führt zur Aktivierung weiterer naiver OT-I Zellen, die die Autoimmunreaktion in Gang halten.

Offenbar ist also die Blut-Hirn-Schranke im Alter von 12 Tagen bereits vollständig geschlossen und erlaubt keine Penetration naiver OT-I Zellen mehr.

Eine initiale Freisetzung von Ovalbumin ist somit unmöglich, weswegen ein OT-I Zelltransfer in 12 Tage alte ODC-OVA Mäuse keine EAE verursacht.

1.2.4.4 Rolle des von OT-I Zellen produzierten Interferon- γ

In Co-Kulturen von Oligodendrozyten aus ODC-OVA Mäusen und OT-I Zellen erkennen OT-I Zellen das ihnen dargebotene Antigen und werden aktiviert. Sie exprimieren vermehrt den ‚early activation marker‘ CD69 und schütten IFN- γ aus. IFN- γ führt nicht nur zur Hochregulation von H-2K^b Molekülen auf der Zelloberfläche von Oligodendrozyten (Agresti et al., 1998) und einer damit einhergehenden vermehrten Antigen-Präsentation, sondern auch zu einer verstärkten Aktivierung der OT-I Zellen.

Im Tiermodell ist IFN- γ ebenso wie TNF (Tumornekrosefaktor) im Plasma ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Mäuse nachweisbar, noch bevor diese Symptome einer EAE entwickeln. Die beiden Zytokine führen auch in vivo zu einer Hochregulation von MHC-I-Proteinen auf Oligodendrozyten (Agresti et al., 1998). Durch eine Reihe von Experimenten mit OT-I Zellen ohne Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion zeigten Na et al., dass IFN- γ in der Pathogenese der OT-I Zell medierten EAE von entscheidender Bedeutung ist.

Mit dem kürzlich beschriebenen Tiermodell einer sich spontan entfaltenden CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE wird also der zunehmend anerkannten essentiellen Rolle der zytotoxischen T-Lymphozyten in der Pathogenese der Multiplen Sklerose Rechnung getragen.

Neben weiteren Untersuchungen zum Verhalten der CD8⁺ T-Zellen in MS und EAE können nun in diesem ODC-OVA/OT-I Mausmodell auch Ansätze zur Therapie der Erkrankung getestet werden.

1.3 Der monoklonale Antikörper 25-D1.16

1.3.1 Sensitivität und Spezifität

CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen kurze Peptide, die aus größeren Protein-Antigenen stammen, gebunden an MHC-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche (Germain, 1994; Townsend et al., 1989; Yewdell and Bennink, 1990). Für die Lyse von Zellen durch zytotoxische T-Zellen mit einem hochaffinen T-Zell Rezeptor (TCR) sind nur wenige solcher Liganden (<10-100) auf der Zielzelle nötig (Christinck et al., 1991; Demotz et al., 1990; Harding and Unanue, 1990; Sykulev et al., 1996), wobei diese Zellen jeweils 10⁵ oder mehr identische MHC-Moleküle, beladen mit Hunderten bis Tausenden von anderen Peptiden auf ihrer Plasmamembran exprimieren (Chicz et al., 1992; Hunt et al., 1992; Rudensky et al., 1991a).

Der von Porgador und Mitarbeitern 1997 generierte monoklonale Antikörper 25-D1.16 (Klasse IgG₁, κ) erkennt den Komplex aus dem Ovalbumin-Peptid SIINFEKL gebunden an H-2K^b-Moleküle (murine MHC-I-Moleküle, siehe Kap. 1.2.2) mit der Sensitivität eines T-Zell-Rezeptors. In Experimenten konnte 25-D1.16 die spezifischen Liganden auf Zellen erkennen, die mit ähnlich geringen Peptidkonzentrationen beladen wurden, wie sie nötig sind, um zytotoxische T-Zell-Linien zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Zerstörung der Zielzellen anzuregen. Damit erkennt der Antikörper Antigen-Komplexe, die in geringer, aber physiologisch relevanter Anzahl exprimiert werden (Porgador et al., 1997).

Doch nicht nur die Sensitivität, auch die Spezifität von 25-D1.16 entspricht der Spezifität von OT-I Zellen (T-Zellen, die ebenfalls die Kombination aus SIINFEKL und MHC-I-Protein erkennen, siehe Kapitel 1.2.3) (Messaoudi et al., 1999; Porgador et al., 1997). Der Antikörper besitzt die Fähigkeit, zwischen mit SIINFEKL beladenen und allen anderen mit Peptiden beladenen MHC-Molekülen zu unterscheiden. Modifizierte SIINFEKL-Varianten, die durch SIINFEKL-spezifische T-Zellen nicht mehr erkannt werden können, bindet er ebenfalls nicht (Jameson et al., 1993).

1.3.2 Affinität von 25-D1.16 zu SIINFEKL:H-2K^b Komplexen

Antikörper, die ein spezifisches Peptid gebunden an ein MHC-Protein erkennen, besitzen in der Regel eine höhere Affinität als ein T-Zell Rezeptor mit derselben Spezifität. Auch der Antikörper 25-D1.16 zeigt bei seinem Bindungsverhalten an SIINFEKL:MHC-I Komplexe eine höhere Affinität als der OT-I TCR (Alam et al., 1996; Porgador et al., 1997). Diese kommt durch eine wesentlich höhere Assoziationsrate (on-rate) zustande bei im Vergleich mit dem OT-I T-Zell Rezeptor ähnlicher Dissoziationsrate (off-rate) (Mareeva et al., 2004). Die Erhöhung der on-rate spiegelt ein präziseres Andocken an den Bindungspartner, sowie eine größere Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Protein-Protein-Interaktion wieder, d.h. einer Bindung von 25-D1.16 an mit SIINFEKL beladene MHC-I-Moleküle.

1.3.3 Lokalisation der Bindungsstellen von 25-D1.16 bzw. OT-I T-Zell Rezeptor am SIINFEKL:MHC-I Komplex

Die Form der Liganden von T-Zell Rezeptoren ist weitgehend konstant, wobei Variationen der Form durch den Polymorphismus der MHC-Moleküle und die Heterogenität der gebundenen Peptide entstehen. Die Tatsache, dass der TCR mit einem relativ festgelegten Areal des Peptid:MHC-Komplexes interagieren muss, bedingt die MHC-Restriktion. Der TCR bindet an eine flache Stelle, die aus den Spitzen der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Helices der MHC-Moleküle und aus 3-5 Aminosäuren des Peptids besteht (Bongrand and Malissen, 1998). Daher sind die Bindungsstellen des TCRs, bestehend aus α - und β -Kette ebenfalls flach, um eine gleichzeitige und maximal spezifische Interaktion mit Peptid und MHC-Ketten zu ermöglichen. Die α -Kette interagiert dabei mit dem N-Terminus, die β -Kette mit dem C-Terminus des Peptid:MHC-Komplexes.

Die Antigen-Bindungsstellen der α - und β -Ketten eines TCRs ähneln den Fab-Fragmenten eines Antikörpers insofern, als sie ebenfalls aus 6 hypervariablen Schleifen (complementary determining regions, CDRs) bestehen, die in antiparallelen β -Faltblättern angeordnet sind (Bongrand and Malissen, 1998; Davies and Metzger, 1983; Davis et al., 1998; Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996; Mazza et al., 1998). Jedoch erkennen Antikörper eine große Vielfalt

von Antigen-Klassen und weisen eine sehr viel flexiblere Art der Interaktion auf (Davies and Metzger, 1983). Die Antigen-Bindungsstellen sind häufig konkav, wodurch die Plastizität erhöht und eine Bindung an verschiedene Klassen von Antigenen ermöglicht wird (Alzari et al., 1988; Mian et al., 1991). Außerdem verändern Antikörper durch Rearrangement der CDR-Schleifen die Form ihrer Bindungsstellen, um sich den Epitopen des Antigens besser anzupassen (MacCallum et al., 1996; Padlan, 1994; Wilson and Stanfield, 1994).

Diese Unterschiede machen eine Erkennung von Peptid:MHC-Komplexen durch die meisten Antikörper mit einer ähnlich hohen Spezifität wie die eines T-Zell Rezeptors unmöglich.

Der monoklonale Antikörper 25-D1.16 aber erkennt das Octapeptid SIINFEKL als antigenes Epitop von Ovalbumin, gebunden an das murine MHC-I-Molekül H-2K^b mit vergleichbarer Spezifität (Mareeva et al., 2004; Porgador et al., 1997).

25-D1.16 interagiert mit den MHC-Ketten am C-Terminus der α 1 Helix, d.h. in dem gleichen Areal, das auch von der β -Kette von OVA-spezifischen T-Zell Rezeptoren gebunden wird. Abbildung 1.5 zeigt die ungefähre Bindungsstelle von 25-D1.16 an das MHC-I-Molekül.

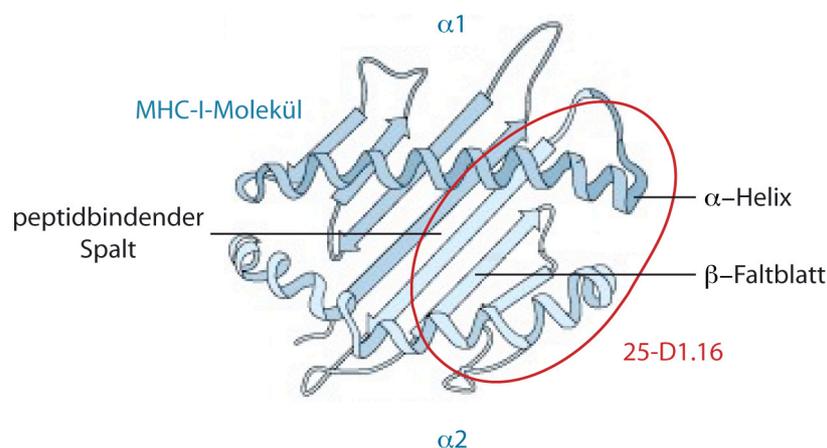


Abb. 1.5 Vorausgesagte Bindungsstelle von 25-D1.16 an ein MHC-I-Protein. Der Antikörper interagiert mit den MHC-Ketten am C-Terminus der α 1 Helix (rote Markierung); in diesem Bereich bindet auch der OT-I TCR (nicht gezeigt). Die Interaktion von 25-D1.16 mit dem Peptid:MHC-I Komplex erstreckt sich jedoch auch auf Bereiche, die der OT-I TCR nicht berührt. Daher überlappen sich die Bindungsstellen zwar in weiten Teilen, sind jedoch nicht identisch. modifiziert nach Nikolic-Zugic et al., 1997.

Die Erkennung von SIINFEKL:H-2K^b durch den Antikörper hängt darüber hinaus wesentlich von den Aminosäuren des Peptids an Position 4, 6 und 7 ab, welche

auch für die Erkennung durch den OT-I TCR essentiell sind (Chen et al., 1993). Mutationen von SIINFEKL an diesen Positionen verhindern sowohl die Bindung des TCRs, als auch die von 25-D1.16 (Dyall et al., 1996; Huard et al., 1997; Nikolic-Zugic and Bevan, 1990).

Diese Daten zeigen, dass die Bindungsstellen von 25-D1.16 und der β -Kette des OT-I T-Zell Rezeptors in weiten Teilen übereinstimmen. Veränderungen an Position 141 der $\alpha 2$ Helix des MHC-Moleküls beeinflussen die Bindung durch den Antikörper, haben jedoch keinen Einfluss auf die Erkennung durch den TCR, was dafür spricht, dass sich die Bindungsstellen überlappen, jedoch nicht identisch sind. Die Interaktion von 25-D1.16 erstreckt sich dabei auf Teile des SIINFEKL:MHC-I Komplexes, die der TCR nicht berührt (Messaoudi et al., 1999). 25-D1.16 weist demnach eine Mischform der Erkennung von Peptid:MHC-I Komplexen auf, die zum Teil der β -Kette eines T-Zell Rezeptors, zum Teil der eines konventionellen Anti-MHC-Antikörpers ähnelt.

1.3.4 Einsatz des Antikörpers 25-D1.16

25-D1.16 wurde bis dato u.a. dazu benutzt, nach Virusinfektion generierte Peptid:MHC-I Komplexe zu quantifizieren, Antigen-präsentierende Zellen in heterogenen Zellpopulationen zu identifizieren, den Ort der Interaktion von Peptid und MHC-I-Molekül innerhalb der Zelle zu bestimmen und Zellen sichtbar zu machen, die nach Infektion bestimmte Peptid:MHC-I Komplexe präsentieren (Porgador et al., 1997). Des Weiteren konnte mit Hilfe von 25-D.16 die Interaktion von T-Zell und B-Zell Rezeptoren mit ihren Liganden untersucht werden (Messaoudi et al., 1999).

Die Ähnlichkeit im Bindungsverhalten des Antikörpers und des OT-I TCR, deren überlappende Bindungsstellen auf dem Antigen und die unterschiedliche Affinität zu dem SIINFEKL:H-2K^b Komplex legen außerdem nahe, dass der OVA-spezifische Antikörper mit OVA-spezifischen T-Zellen konkurrieren und die Antigen-Erkennung durch die zytotoxischen T-Lymphozyten verhindern könnte.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine mögliche Interferenz des Antikörpers 25-D1.16 mit der Stimulation von OVA-spezifischen CD8⁺ T-Lymphozyten durch SIINFEKL zu untersuchen.

Es sollte hierfür zunächst durch FACS-Analysen nachgewiesen werden, dass 25-D1.16 SIINFEKL:MHC-I Komplexe mit hoher Sensitivität und Spezifität erkennt. Durch Immunfluoreszenz-Analyse sollte die Interaktion mit Peptid-beladenen MHC-I-Molekülen visualisiert werden.

Des Weiteren sollte in einem in vitro Versuchsaufbau ergründet werden, ob der Antikörper 25-D1.16 die Erkennung von SIINFEKL/H-2K^b durch OT-I Zellen blockieren kann. Als Antigen-präsentierende Zellen sollten sowohl Zellen zum Einsatz kommen, deren MHC-I-Proteine artifiziell mit SIINFEKL beladen werden können (Schumacher et al., 1990; Townsend et al., 1989), als auch Zellen, die das Peptid endogen produzieren und über MHC-I-Moleküle präsentieren. Die Wirkung der Anwesenheit von 25-D1.16 auf die Aktivierung der OT-I Zellen sollte anhand dreier Parameter gemessen werden: Es sollten FACS-Analysen zur Messung der Expression eines Aktivierungsmarkers (early activation marker), Proliferationsassays zur Bestimmung der OT-I Zellproliferation und Zytokin-ELISAs zur Quantifizierung der IFN- γ -Sekretion durchgeführt werden.

Im Anschluss sollte der Effekt von 25-D1.16 im Tiermodell untersucht werden. Konzeptionell ist die antigenspezifische Behandlung von Autoimmunkrankheiten eine der attraktivsten Vorgehensweisen. Deshalb sollte 25-D1.16 als therapeutische Strategie im Mausmodell der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE eingesetzt werden. Um herauszufinden, ob der Antikörper die OT-I Zell-Aktivierung in vivo verhindern kann, sollte ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen (Na et al., 2008) 25-D1.16 in verschiedenen Konzentrationen verabreicht werden. Anschließend sollte der EAE-Krankheitsverlauf beobachtet werden. Durch histologische und immunhistochemische Analyse von Gewebeschnitten aus dem ZNS der behandelten Mäuse sollte die Entzündungsaktivität im Gehirn und Rückenmark bestimmt und mit der unbehandelten Mäuse verglichen werden.

Abbildung 1.6 veranschaulicht nun noch einmal zusammenfassend schematisch die Hypothese der Experimente dieser Arbeit.

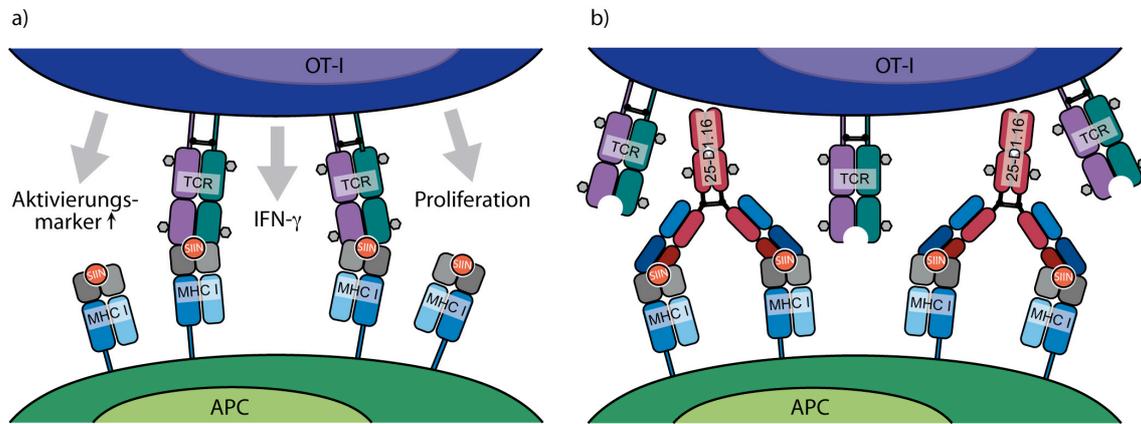


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Hypothese der Experimente dieser Arbeit. a) Aktivierung der OT-I Zellen durch ungehinderte Interaktion des OT-I TCR mit dem SIINFEKL:MHC-I Komplex mit daraus folgender Hochregulation von Aktivierungsmarkern, IFN- γ Ausschüttung und Steigerung der Proliferationsrate. b) Fehlende/Verminderte Aktivierung der OT-I Zellen aufgrund von Interferenz mit der Erkennung des Autoantigens SIINFEKL durch kompetitive Inhibition der TCR – SIINFEKL:MHC-I Interaktion durch den monoklonalen Antikörper 25-D1.16.

2 Material

Antikörper

Antikörper für CD8⁺ T-Zell Isolation

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD4	Biotin Ratte anti-Maus CD4	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD11b	Biotin Ratte anti-Maus CD11b	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD45R/B220	Biotin Ratte anti-Maus CD45R/B220	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD49b/ Pan-NK cells	Biotin Ratte anti-Maus CD49b / Pan-NK cells	BD Biosciences (Pharmingen, D)
TER-119	Biotin Ratte anti-Maus TER119 / erythroid cells	BD Biosciences (Pharmingen, D)
IgG	Biotin Ziege anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, USA)
IgG	Biotin Maus anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, USA)

Antikörper für FACS-Färbungen

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD4	FITC / PE / PerCP Ratte anti-Maus CD4	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD8 α	FITC / PE Ratte anti-Maus CD8	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD16/CD32	anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor (= Fc-Block))	BD Biosciences (Pharmingen, D)
CD69	FITC Hamster anti-Maus CD69	BD Biosciences (Pharmingen, D)
V α 2-TCR	FITC / PE Ratte anti-Maus V α 2	BD Biosciences (Pharmingen, D)
V β 5-TCR	FITC Ratte anti-Maus V β 5	BD Biosciences (Pharmingen, D)
H-2K ^b	Biotin Ratte anti Maus H-2K ^b	BD Biosciences (Pharmingen, D)
Isotypkontrolle	FITC / PE Ratte IgG _{1, κ}	BD Biosciences (Pharmingen, D)

<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Bezugsquelle</i>
FITC-conjugated F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG H+L	Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, USA)
PE-conjugated F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG H+L	Jackson ImmunoResearch (Bar Harbor, USA)

Sonstige Antikörper / serologische Reagenzien

<i>Antikörper / Reagenz</i>	<i>Bezugsquelle / Referenz</i>
25-D1.16	(Porgador et al., 1997)
PPV06 (Maus-IgG ₁ -Isotypkontrolle)	ExBio (Prag, CZ)
anti-Maus H-2K ^b	BD Biosciences (Pharmingen, D)
D665	ExBio (Prag, CZ)
FITC Streptavidin-Cychrom	BD Biosciences (Pharmingen, D)
PE Streptavidin-Cychrom	BD Biosciences (Pharmingen, D)
Ratte anti-Maus CD3 (für Immunhistochemie)	Serotec (Düsseldorf, D)
Ratte anti-Maus Mac-3 (für Immunhistochemie)	BD Biosciences (Pharmingen, D)
Biotin anti-Ratte IgG (H+L)	Vector (Burlingame, USA)

Chemikalien und Reagenzien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, D)
Agarose	AppliChem (Darmstadt, D)
Ammoniumpersulfat	Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	AppliChem (Darmstadt, D)
Betaplate-Szintillationsflüssigkeit	Wallac Oy (Turku, Finnland)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe, D)
Bradford-Reagenz	Biorad
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, D)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Citronensäure	Roth (Karlsruhe, D)
Coomassie Brilliant Blau G-250	Sigma (Deisenhofen, D)
Coomassie Brilliant Blau R-250	Sigma (Deisenhofen, D)
DAPI (4',6 Diamidin-2-Phenylindoldihydrochlorid)	Dako A/S (Glostrup, DK)
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Merck (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt, D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe, D)
DNA-Marker GeneRuler 1 kb DNA-Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
DNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
EDTA	Roth (Karlsruhe, D)
Entellan	Merck (Darmstadt, D)
Eosin	Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäure 100%	AppliChem (Darmstadt, D)
Ethanol 99%, 96%, 70%	Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)

Fluoromount G	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Geneticin G418	Gibco BRL (Eggenstein, D)
Glycerol	Roth (Karlsruhe, D)
Glycin	AppliChem (Darmstadt, D)
Hämatoxylin	Sigma (Deisenhofen, D)
[³ H] Thymidin (spez. Aktivität 5 mCi)	Amersham Biosciences (Braunschweig, D)
Isopropanol 100%	AppliChem (Darmstadt, D)
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumdisulfit (K ₂ S ₂ O ₅)	Merck (Darmstadt, D)
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Pharmacia (Karlsruhe, D)
Lithiumcarbonat	Aldrich-Chemie (Steinheim, D)
L(+)-Glutamin	Gibco BRL (Eggenstein, D)
Luxol Fast Blue	ABCR (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Ferak (Berlin, D)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck (Darmstadt, D)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Mitomycin C	Sigma (Deisenhofen, D)
Molmassenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Natriumazid (NaN ₃)	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Ferak (Berlin, D)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt, D)
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Ferak (Berlin, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ferak (Berlin, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Ferak (Berlin, D)
Paraformaldehyd 4%	Roth (Karlsruhe, D)
Perjodsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Phenolrot	Sigma (Deisenhofen, D)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Ferak (Berlin, D)
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma (Deisenhofen, D)
Proteinase K	PAN Biotech (Aidenbach, D)
Protein G Sepharose	Amersham Biosciences (Braunschweig, D)
Salzsäure 37% rauchend (HCl)	Roth (Karlsruhe, D)
Schiffs Reagenz	Roth (Karlsruhe, D)
Siedesteinchen	Roth (Karlsruhe, D)
SIINFEKL	IBA (Göttingen, D)
Streptavidin Microbeads	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
TEMED	Roth (Karlsruhe, D)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem (Darmstadt, D)
Triton X-100 0,1 %	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypanblau	Sigma (Deisenhofen, D)

Tween-20	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid 3% (H ₂ O ₂)	Roth (Karlsruhe, D)
Xylazinhydrochlorid 0,8 mg/ml	Bayer (Leverkusen, D)
Xylol	Roth (Karlsruhe, D)

Kits

<i>Kit</i>	<i>Inhalt</i>	<i>Bezugsquelle</i>
OptEIA™ Set Mouse IFN- γ (für ELISA)	capture ab: anti-mouse IFN- γ , detection ab: biotinylated anti-mouse IFN- γ , enzyme reagent: avidin-horseradish peroxidase conjugate, standards: recombinant mouse IFN- γ	BD Biosciences (Pharmingen, D)
TMB Substrate Reagent Set (für ELISA)	Substrate Reagent A, Substrate Reagent B	BD Biosciences (Pharmingen, D)
StreptAB-Komplex/HPR-Duett (für Immunhistochemie)	Lösung A und Lösung B (Maus/Kaninchen)	Dako A/S (Glostrup, DK)
Panscript DNA Polymerases	Taq-Polymerase, 10x Puffer, MgCl ₂	PAN Biotech (Aidenbach, D)

Oligonucleotide für OVA-PCR

Vorwärts-Primer	5'-TTC-CAG-GAT-TCG-GAG-ACA-CT-3'	20 bp	Apara Bioscience, (Denzlingen, D)
Rückwärts-Primer	5'-TGA-GGA-GAT-GCC-AGA-CAG-AT-3'	20 bp	Apara Bioscience, (Denzlingen, D)

Zellkultur

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
DMEM (1x)	Gibco BRL (Eggenstein, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma (Deisenhofen, D)
L(+)-Glutamin 5%	Gibco BRL (Eggenstein, D)
β -Mercaptoethanol	Gibco BRL (Eggenstein, D)
Natriumpyruvat	Gibco BRL (Eggenstein, D)
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco BRL (Eggenstein, D)
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL (Eggenstein, D)
RPMI 1640 (1x)	Gibco BRL (Eggenstein, D)

Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Kulturmedia

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (POD) (siehe Kits)

Lösung A		10	µl
Lösung B		10	µl
PBS	ad	1	ml
Inkubationszeit vor Benutzung		20	min

Blocking Puffer für ELISAs (pH 7,0)

FCS in PBS ⁻		10	%
----------------------------	--	----	---

BSS (balanced salt solution)

BSS I		1	Vol.
BSS II		1	Vol.
ddH ₂ O		8	Vol.

BSS I

Glucose		50	g
KH ₂ PO ₄		3	g
Na ₂ HPO ₄		11,9	g
Phenolrot		0,5	g
ddH ₂ O	ad	5	l

BSS II

CaCl ₂		9,25	g
KCl		20	g
NaCl		320	g
MgCl ₂		10	g
MgSO ₄		10	g
ddH ₂ O	ad	5	l

BSS/BSA

BSA (Bovine Serum Albumin) in BSS		2	%
--------------------------------------	--	---	---

Citratpuffer (pH 6,0)

0,1 M Citronensäure		18	ml
0,1 M Natriumcitrat		82	ml
ddH ₂ O	ad	1	l

Coating Puffer für ELISAs (pH 9,4)

NaHCO ₃	8,4	g
Na ₂ CO ₃	3,56	g
ddH ₂ O	ad 1	l

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau G-250	1	g	
in Methanol	200	ml	lösen
Coomassie Brilliant Blau R-250	1	g	
in ddH ₂ O	200	ml	lösen
Essigsäure 100%	40	ml	zugeben u. Lösung
filtrieren			

DAB-Lösung

PBS	10	ml	
3% H ₂ O ₂	75	µl	
DAB	1	Tablette	lösen, anschließend filtrieren

DMEM+ 10% FCS

DMEM	500	ml
SC	50	ml
FCS, hitzeinaktiviert (30 min bei 56 °C)	25	ml

Einfriermedium

DMEM	70	%
FCS	20	%
DMSO	10	%

Entfärbelösung (für Coomassie-Färbung)

Essigsäure 100%	75	ml
Methanol	250	ml
ddH ₂ O	ad 1	l

Eosin 1%

Eosin	10	g
Ethanol 70%	1	l
Essigsäure 100%	3	Tropfen

FACS-Puffer

BSA	0,1	%
NaN ₃	0,01	%
in PBS		

Fixierlösung

Paraformaldehyd	2	%
	oder	
	4	%

in PBS

Gey's Lyselösung

Stock A

NH ₄ Cl	35	g
KCl	1,85	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,5	g
KH ₂ PO ₄	0,12	g
Glucose	5	g
ddH ₂ O	ad 1000	ml

Stock B

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,42	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,14	g
CaCl ₂	0,34	g
ddH ₂ O	ad 100	ml

Stock C

NaHCO ₃	2,25	g
ddH ₂ O	ad 100	ml

Gey's Lyselösung

Stock A	20	Vol.
Stock B	5	Vol.
Stock C	5	Vol.
ddH ₂ O	70	Vol.

Laufpuffer für Agarose-Gelelektrophorese (1x)

Tris gelöst in ddH ₂ O	3	g
Glycin gelöst in ddH ₂ O	14,4	g
SDS	10	%
ddH ₂ O	ad 1	l

Luxol Fast Blue (LFB)-Lösung 1%

Luxol Fast Blue	1	g
Ethanol 96%	1	l
Essigsäure 10%	5	ml

Lysepuffer für genomische DNA-Isolierung

Tris-HCl (pH 8,0)	50	mM
EDTA	100	mM
NaCl	100	mM
SDS	1	%

PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4)

NaCl	8	g
Na ₂ HPO ₄	1,15	g
KCl	0,2	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
MgCl ₂	0,1	g
CaCl ₂	0,17	g
dd H ₂ O	ad 1	l

PBS⁻ (pH 7,4)

NaCl	8	g
Na ₂ HPO ₄	1,15	g
KCl	0,2	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
dd H ₂ O	ad 1	l

PBS/Azid

NaN ₃ in PBS	0,02	%
----------------------------	------	---

Perjodsäure 1%

Perjodsäure	1	g
dd H ₂ O	ad 100	ml

POD-Block

Methanol	8	ml
2 M NaN ₃	1,2	ml
H ₂ O ₂ 3%	2	ml

Probenpuffer (reduzierend) für Agarose-Gelelektrophorese (4x)

Glycerol	1,5	ml
SDS 10%	2	ml
Tris-HCl (pH 6,8)	1	ml
Bromphenolblau 0,16%	1,5	ml
β-Mercaptoethanol	475	µl
dd H ₂ O	3,5	ml

RPMI 1640+ 10% FCS

RPMI 1640	500	ml
SC	50	ml
FCS, hitzeinaktiviert (30 min bei 56 °C)	25	ml

SC

FCS, hitzeinaktiviert (30 min bei 56 °C)	500	ml
Natriumpyruvat	100	ml
nicht-essentielle Aminosäuren	100	ml
Penicillin-Streptomycin	100	ml
β-Mercaptoethanol	5	ml
L(+)-Glutamin 5%	60	ml

Stopplösung für ELISAs

1 M H₃PO₄

Sulfit-Waschlösung

Salzsäure 37% rauchend	5	ml
K ₂ S ₂ O ₅ 10%	20	ml
dd H ₂ O	ad	500 ml

TBE-Puffer

5x konzentrierte Stock-Lösung

Tris Base	54	g
Borsäure	27,5	g
EDTA (0,5 M; pH = 8,0)	20	ml
dd H ₂ O	ad	1 l

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,04	%
in PBS/Azid		

Waschpuffer für ELISAs

Tween-20	0,05	%
in PBS ⁻		

Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Besonderheiten</i>	<i>Referenz</i>	<i>Kulturbedingungen</i>
EL4	9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracen induzierte Thymom-Zelllinie aus C57BL/6 Mäusen	(Moore et al., 1988)	DMEM+ 10% FCS
EG.7-OVA	transfizierter Klon der EL4	(Moore et	DMEM+ 10% FCS

	Zellreihe, der Ovalbumin exprimiert	al., 1988)	+ Geneticin (400 µg/ml)
25-D1.15	Hybridom-Zelllinie (durch Fusion mit Myelomzellen immortalisierte antikörperproduzierende B-Lymphozyten)	(Porgador et al., 1997)	DMEM+ 10% FCS

Versuchstiere

Es wurden folgende pathogenfreie Inzuchtstämme verwendet:

<i>Mäuse</i>	<i>Referenz</i>	<i>Herkunft</i>
OT-I	(Hogquist et al., 1994)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
ODC-OVA	(Cao et al., 2006)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
ODC-OVA/OT-I	Kreuzung von OT-I transgenen (Hogquist et al., 1994) und ODC-OVA transgenen Mäusen (Cao et al., 2006)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg
OT-I/RAG	Kreuzung von OT-I transgenen (Hogquist et al., 1994) und RAG Knockout Mäusen (Schwarz et al., 1993)	Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

Verbrauchsmaterial

Einwegsspritzen 1 ml	Dispomed (Gelnhausen, D)
Einwegsspritzen 10 ml	Codan Medical ApS (Rødby DK)
Eppendorf-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
FACS-Röhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Filter zur Sterilisation (Porenweite 0,2 µm)	Millipore (Bedford, USA)
Filter zur Sterilisation (Porenweite 0,45 µm)	Schleicher & Schuell Microscience (Dassel, D)
Injektionskanülen gelb	B. Braun (Melsungen, D)
Injektionskanülen orange	BSM medical (Hamburg, D)
Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden, D)
Kulturflaschen 50 ml, 250 ml, 550 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Kulturplatten, 96-well, Flachboden	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Liquid Blocker (hydrophober Markerstift)	SCI Science (München, D)
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)

PCR-Tubes	Hartenstein (Würzburg, D)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Printed Filtermat A	Wallac Oy (Turku, FIN)
Probentaschen für Proliferationsassay	Wallac Oy (Turku, FIN)
Standard-Küvetten (Plastik)	Brand (Wertheim, D)
Steriflip	Millipore (Bedford, USA)
Ultrafiltrationseinheit (Centrex UF-2 30kDa)	Schleicher & Schuell Microscience (Dassel, D)
Whatman Filterpapier	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellsieb (Nylon, Porenweite 70 µm)	BD Biosciences (Pharmingen, D)

Geräte

Betaplate Harvester	Tomtec (Hamden, USA)
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
ELISA-Reader (kinetic microplate reader)	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Flüssigkeitsszintillationszähler	Wallac Oy (Turku, FIN)
Fotospektrometer (Ultrospec 2000)	Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Konfokales Laserscanmikroskop (Laser Scanning Microscope LSM 510 META)	Zeiss (Jena, D)
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein (Würzburg, D)
Mikroskop für Immunfluoreszenz und Histologie (Leica DMIRE2)	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
PCR-Cycler (T3 Thermocycler)	Biotron (Göttingen, D)
Phasenkontrastmikroskop (Leica DMLS)	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Schlittenmikrotom (Leica SM200R)	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Vakuumtrockner (Drystar)	Hözel (Wörth, D)
Wasserbad Medax	Nagel (Kiel, D)
Zentrifuge EBA 12 R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Dupont (USA)
Zentrifuge Varifuge 20 RS	Heraeus (Hanau, D)
Einbettmaschine Citadel (Shandon) 1000 Wax Bath	Thermo Electron Corporation (Runcorn, UK)

3 Methoden

3.1 Aufreinigung des Antikörpers 25-D1.16

3.1.1 Proteinextraktion

Die Proteinfällung erfolgte mittels Ammoniumsulfat. Dieses Salz eignet sich besonders gut, da es stark hydratisierte Ionen bildet. Dem Protein werden auf diese Weise Wasserdipole entzogen und es flockt aus.

Zunächst wurde der Überstand der Antikörper-produzierenden Hybridoma-Kulturen abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4°C) und gesammelt.

Ammoniumsulfat als gesättigte Lösung wurde im Kältelabor (bei 4°C) unter Rühren vorsichtig portionsweise zugegeben, bis die Löslichkeitsgrenze überschritten war. Über Nacht wurde der Ansatz im Kältelabor mittels Magnetschüttler langsam weitergerührt.

Am Folgetag wurden die Niederschläge der Ammoniumsulfat-Fällung durch Zentrifugation (30 min, 6000 rpm, 4°C) vom Überstand abgetrennt. Das Sediment wurde in Puffer (PBS⁻, 30ml pro 1,5 l Überstand) resuspendiert.

Anschließend erfolgte die Entsalzung durch Dialyse in PBS über 48 Stunden, wobei die Dialyseflüssigkeit alle 12 Stunden ausgewechselt wurde.

Das Dialysat wurde erneut zentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4°C) und der Überstand gesammelt.

3.1.2 Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf einer spezifischen, reversiblen Bindung der Proteine an einen Liganden der Gelmatrix. Es lassen sich hiermit hohe Reinheiten und Ausbeuten erzielen.

Protein G Sepharose dient der Bindung der Fc-Anteile des aufzureinigenden Antikörpers. Es wurde in 0,1% Azid/PBS bei 4°C gelagert.

25 ml Säulenmaterial wurden mit 25 ml PBS⁻ aufgefüllt und durch Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt.

Zur Bindung des Antikörpers an die Beads wurden Protein G und Proteinlösung in einem Falcon-Röhrchen über Nacht an einen Rotator gebunden und bei niedrigster Umdrehungszahl rotiert.

Der Inhalt des Falcon-Röhrchens wurde am folgenden Tag in die Affinitätssäule gegeben und mit PBS⁻ so lange gewaschen, bis der Durchfluss keine ungebundenen Proteine mehr enthielt.

Die Eluation der Antikörper erfolgte durch pH-Senkung mit 3-5 Bettvolumen 0,1 M Glycin (pH 3,0). 1/10 Volumen (100 µl) 1 M Tris (pH 8,0) wurde in den Fraktionsröhrchen vorgelegt, um die Antikörper nicht länger als nötig dem niedrigen pH-Wert auszusetzen. Es wurden 10 Fraktionen à 1 ml gesammelt.

Die Säule wurde direkt nach der Elution mit Waschpuffer gespült. Die Protein G Sepharose wurde anschließend wieder in 0,1% Azid/PBS bei 4°C gelagert.

3.1.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der eluierten Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt.

Zum Messen der Proben wurde in 1 ml Standard-Küvetten 1 ml Bradford-Reagenz vorgelegt und mit jeweils 1 µl aus den einzelnen Fraktionsröhrchen auf dem Vortexer kurz geschüttelt. Nach 5 Minuten Reaktionszeit erfolgte die Messung der Extinktion im Fotospektrometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm. Anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

3.1.4 Konzentrierung des Antikörpers mittels Ultrafiltrationsmembran und Pufferwechsel

Die Proben mit dem isolierten Antikörper wurden durch Zentrifugation (je nach Bedarf 20-30 min, 3000 rpm, 4°C) mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit (Centrex UF-2 30 kDa, Schleicher & Schuell Microscience) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa aufkonzentriert und auf PBS umgepuffert.

3.1.5 Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE

Die Reinheit des isolierten Antikörpers 25-D1.16 wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese überprüft.

3.1.5.1 Probenvorbereitung

Jeweils 1 µg, 5 µg und 10 µg der Proben (isolierter Antikörper 25-D1.16 und kommerziell hergestellter Antikörper D665 als Kontrolle) wurden zusammen mit 10 µl des reduzierenden Probenpuffers in Eppendorf-Röhrchen 5 min lang bei 95 °C erhitzt. Durch das Zusammenspiel von SDS, Hitze und Reduktionsmittel werden alle Proteine in den Proben vollständig denaturiert, linearisiert und von einer Hülle aus negativ geladenen SDS-Proteinen umgeben. Nach dem Abkühlen wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert, um die Proteine am Boden des Gefäßes zu konzentrieren.

3.1.5.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Glasplatten und Plastikteile wurden vor dem Zusammenbau der Elektrophoreseapparatur desinfiziert. Durch Einfüllen von destilliertem Wasser wurde kontrolliert, ob die Apparatur dicht ist.

Entsprechend der erwarteten Proteingröße wurden ein 10 %iges Sammelgel und ein 10 %iges Trenngel mit folgender Zusammensetzung eingesetzt.

Sammelgel (5 ml)	3,4	ml	destilliertes Wasser
+	0,83	ml	Acrylamid (30%)
+	0,63	ml	1,0 M Tris (pH 6,8)
+	0,05	ml	10% SDS
+	0,05	ml	10% Ammoniumpersulfat
+	0,005	ml	TEMED
Trenngel (15 ml)	5,9	ml	destilliertes Wasser
+	5,0	ml	Acrylamid (30%)
+	3,8	ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
+	0,15	ml	10% SDS
+	0,15	ml	10% Ammoniumpersulfat
+	0,006	ml	TEMED

Das Sammelgel dient dazu, die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel zu fokussieren, sodass diese nahezu gleichzeitig in das Trenngel einwandern können.

Das Trenngel wurde zwischen die Glasscheiben pipettiert und mit etwas destilliertem Wasser übergossen, um einen geraden Abschluss des Gels zu erreichen. Nach der Polymerisation wurde die Wasserschicht mit einem Filterpapier abgesaugt. Es wurden 5 ml Sammelgel abgefüllt, der Probenkamm sofort eingesetzt und die Polymerisation abgewartet.

Im Anschluss an das Abfüllen der Gele wurden diese in die Klemm-Halterung eingespannt und in den Elektrophorese-Tank eingesetzt, welcher mit 1x-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nach Entfernung des Kamms wurden die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer gespült und mit dem Mol-Massen-Standard (5 µl) und den Proben nach Schema beladen.

Die Elektrophorese wurde mit 80 V gestartet. Sobald die am Bromphenolblau erkennbare Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

3.1.5.3 Coomassie Färbung

Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel aus der Halterung geschnitten, mit der Coomassie Färbelösung bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schüttler gefärbt, bis die Banden des Standards deutlich sichtbar waren.

Danach erfolgte die Entfärbung in der Entfärbelösung. Das Gel wurde dann für 10 min in destilliertem Wasser sanft geschüttelt, für die Vakuum-Trocknung auf Whatman Filterpapier aufgezogen und auf dem Vakuumtrockner bei 80°C eine Stunde lang getrocknet.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Erhaltungskultur

Alle verwendeten Zelllinien (EL4, EG.7-OVA, 25-D1.16) wurden in DMEM+ 10% FCS bei 37°C, 5% CO₂ und 94% Wassersättigung in sterilen Plastikgefäßen

kultiviert. Der EG.7-OVA Zellkultur wurden zusätzlich als Antibiotikaschutz 400 µg/ml Geneticin zugegeben.

3.2.2 Einfrieren von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, abzentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4°C) und in Einfriermedium (70% DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) aufgenommen (2 x 10⁶ Zellen/ml). Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und rasch bei -70°C eingefroren. Die endgültige Aufbewahrung erfolgte ab dem nächsten Tag bei -140°C.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und dann schnell in 10 ml DMEM+ überführt, um das bei Raumtemperatur für die Zellen toxische DMSO zu verdünnen. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und im Brutschrank weiter kultiviert.

3.3 Präparation von Lymphozyten aus verschiedenen Geweben transgener Mäuse

3.3.1 Aufbereitung der Organe

Die Versuchstiere wurden durch Begasung mit CO₂ getötet. Anschließend wurden ihnen die Lymphknoten (axillär, zervikal, inguinal, mediastinal und mesenterial), sowie Thymus und Milz entnommen.

Die Organe wurden in 10 ml gekühltes BSS/BSA überführt, von Geweberesten gereinigt und durch ein feinmaschiges Plastiksieb gerieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen bei 1600 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für weitere Arbeiten in einem dafür geeigneten Medium resuspendiert.

3.3.2 Hämolyse

Die neben den Lymphozyten in der Milz-Zellsuspension vorhandenen Erythrozyten wurden lysiert.

Hierfür wurde das Pellet nach der Zentrifugation in 2 ml Gey's Lyselösung aufgenommen und 7 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml BSS/BSA zugegeben und erneut 5 min bei 1600 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde wieder mit BSS/BSA gewaschen, bevor die Zellen in ein für weitere Versuche geeignetes Medium aufgenommen wurden.

3.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Durch Verdünnung der Suspension mit 0,04 %iger Trypanblau-Lösung erscheinen vitale Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop klein und lichtbrechend, während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und sich blau färben. Je nach Dichte der Zellsuspension variierte das Verdünnungsverhältnis zwischen 1:2 und 1:100. In der Neubauer-Zählkammer wurden die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Gesamtkonzentration einer Zellsuspension ergab sich anhand Berechnung mit folgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl} / \text{Anzahl ausgezählter Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \\ = \text{Zellzahl} / \text{ml.} \end{aligned}$$

3.4 Durchflusszytometrie im Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Unterscheidung von Zellen anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung.

Für die Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle werden sie mit fluoreszenzgekoppelten, monoklonalen Antikörpern direkt oder indirekt markiert.

Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die markierten Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden. Dadurch kommt es zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Über ein System aus Filtern und Spiegeln wird die abgehende Strahlung nach Wellenlängenbereichen getrennt und von Detektoren registriert. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff erhält man somit ein spezifisches Signal.

Außerdem lässt sich, unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen, eine Aussage über Größe und Granularität der Zellen treffen. Die nach vorne abgelenkten Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen (Forwardscatter, FSC). Das in einem Winkel von 90° abgestrahlte Seitwärtsstreulicht wird als Sidescatter (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgranularität.

Mittels Durchflusszytometrie können also nach Färbung von Oberflächenmolekülen eine Subpopulation von Zellen definiert und Zusammensetzungen von Zellsuspensionen, Reinheit von Zellisolaten, etc. überprüft werden.

Zum anderen gibt es Oberflächenmoleküle, die bei Aktivierung oder Proliferation von Zellen spezifisch vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Eine Detektion dieser Moleküle kann also Aussagen über den funktionellen Zustand der Testpopulation ermöglichen.

3.4.1 Oberflächenfärbungen

Für FACS-Färbungen in dieser Arbeit wurde folgendes Protokoll verwendet:

1 – 5 x 10⁵ Zellen in 100 µl FACS-Puffer (PBS/BSA/Azid) wurden in ein FACS-Röhrchen überführt. Zwischen sämtlichen Schritten wurde durch Zugabe von 3 ml FACS-Puffer und Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und 4°C gewaschen. Ungebundene Antikörper wurden auf diese Weise entfernt.

Um unspezifische Antikörperbindungen und damit falsch-positive Färbungen zu minimieren, wurden die Zellen zunächst für 10 min auf Eis mit Fc-Block (anti-Maus CD16/CD32 = Fc γ III/II Rezeptor, Verdünnung 1:200 in FACS-Puffer, 50 µl pro Röhrchen) inkubiert.

Danach wurden direkt konjugierte Antikörper in sättigender Konzentration zugegeben und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es wurden folgende FITC-konjugierte, PE-konjugierte und biotinylierte Antikörper verwendet.

<i>Antigen</i>	<i>Antikörper</i>
CD4	FITC / PE / Biotin anti-Maus CD4
CD8 α	FITC / PE anti-Maus CD8
CD69	FITC anti-Maus CD69
V α 2-TCR	FITC / PE anti-Maus V α 2
V β 5-TCR	FITC anti-Maus V β 5
H-2K ^b	Biotin anti-Maus H-2K ^b
Isotypkontrolle	FITC / PE Ratte IgG ₁ , κ Isotyp Standard

Zur Detektion der gebundenen biotinylierten Antikörper erfolgte eine erneute Inkubation der Zellen mit Streptavidin-Cychrome^R (FITC oder PE) für weitere 10 min bei 4°C.

Im Falle einer indirekten Färbung wurde nach Inkubation mit dem Primärantikörper für 30 min bei 4°C der FITC- oder PE-konjugierte Sekundärantikörper aufgebracht und weitere 30 min bei 4°C auf den Zellen belassen. Folgende Primär- und Sekundärantikörper kamen zum Einsatz:

Primärantikörper	25-D1.16, PPV06, anti-H-2K ^b
Sekundärantikörper	PE-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L), FITC-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L);

Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellen in 150 μ l FACS-Puffer aufgenommen und konnten am Durchflusszytometer analysiert werden.

Bei jeder Färbung wurden geeignete Isotypkontrollen mitgeführt.

Konnten die Zellen nicht sofort analysiert werden, wurden sie mit 150 μ l 2% Paraformaldehyd pro Röhrchen fixiert und bis zur Auswertung maximal 24 Stunden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

3.4.2 Messung und Analyse

Für die Messung wurde ein FACScan, bzw. FACSCalibur benutzt.

Zunächst wurden die Zellen in einem Dot-Plot betrachtet, bei dem die Parameter FSC und SSC gegeneinander aufgetragen sind. Hierdurch lassen sich verschiedene Zellpopulationen abgrenzen und lebende Zellen von toten Zellen und Zelltrümmern unterscheiden. Um die zu untersuchende Population wurde ein „Gate“ gelegt. So wurden nur die innerhalb dieses „Gate“ liegenden Zellen registriert und weiter charakterisiert.

Für die Kompensationseinstellungen wurden ungefärbte, bzw. mit der Isotypkontrolle gefärbte Zellen und Einfachfärbungen mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

Für jede einzelne Färbung wurden 10.000 bis 20.000 Zellen analysiert und aufgezeichnet.

Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cell Quest-Software von BD Biosciences.

3.5 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse diente der Visualisierung des an SIINFEKL:MHC-I-Komplexe gebundenen Antikörpers 25-D1.16.

Es wurde eine indirekte Färbung durchgeführt, bei der die Primärantikörper durch einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen wurden. Zwischen allen Schritten wurde mit FACS-Puffer gewaschen.

EL4 Zellen, mit SIINFEKL beladene EL4 Zellen (Inkubationszeit 1,5 Stunden, SIINFEKL-Konzentration = 1 μ g/ml) und EG.7-OVA Zellen (je 3×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen) wurden mit FACS-Puffer gewaschen und zur Blockierung der Fc-Rezeptoren mit Fc-Block (anti-Maus CD16/CD32 = Fc γ III/II Rezeptor, Verdünnung 1:200 in FACS-Puffer, 50 μ l pro Röhrchen) 10 min bei 4°C inkubiert.

Als Primärantikörper wurden 100 µl 25-D1.16, PPV06 als Negativkontrolle und anti-Maus H2K^b als Positivkontrolle in einer Konzentration von 5 µg/ml aufgetragen und für 30 min bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper (FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG H+L, Verdünnung 1:500 in FACS-Puffer, 100 µl pro Röhrchen) für ebenfalls 30 min bei 4°C.

Währenddessen wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid beschichtet: je 1 ml Poly-L-Lysin (Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser) wurde auf Objektträger aufgetragen. Es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 37°C, ein Waschschriff mit destilliertem Wasser und die Trocknung bei 37°C.

Nach dem Aufbringen des Sekundärantikörpers wurden die Zellen mit 200 µl 2 % Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert.

Zur Permeabilisierung der Zellmembran für die Kernfärbung wurden 200 µl 0,1 % Triton X-100 in PBS zugegeben und für 10 min auf den Zellen belassen.

DAPI (4',6 Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) bindet selektiv an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. Die Färbung mit DAPI (Verdünnung 1:500 in PBS) erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Zum Schluss wurden die Zellen resuspendiert und auf die vorbereiteten Objektträger aufgebracht. Sie wurden mit 3 Tropfen Fluoromount G eingedeckelt und getrocknet. Durch Lichtschutz wurde ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs vermieden.

Die Analyse erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop, bzw. einem konfokalen Laserscanmikroskop.

3.6 Magnetische Zellseparation (MACS)

Immunmagnetische Zelltrennung (MACS, magnetic cell sorting) wird verwendet, um spezifische Zellpopulationen zu isolieren.

Dafür werden monoklonale Antikörper, an die kleine magnetische Partikel, sogenannte Microbeads gekoppelt sind, genutzt. Die Zellen werden mit den gewünschten Antikörpern markiert und durch eine Säule geleitet, die Eisenwolle (ferromagnetische Matrix) enthält und sich innerhalb eines starken Magnetfeldes

befindet. Markierte Zellen werden im Magnetfeld zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen ungehindert durch die Säule fließen und aufgefangen werden können. Nach Inaktivierung des Magnetfeldes können die markierten Zellen dann ebenfalls eluiert und gesammelt werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Negativ-Selektion verwendet, bei der die irrelevanten Zellen markiert und in der Säule festgehalten werden.

3.6.1 CD8⁺ T-Zell Aufreinigung aus OT-I transgenen Mäusen

Frisch präparierte Lymphknotenzellen (siehe Kapitel 3.3) aus 6-8 Wochen alten OT-I transgenen Mäusen wurden mehrmals in BSS/BSA gewaschen und auf 1×10^8 Zellen / ml eingestellt.

Für die Negativ-Selektion der CD8⁺ T-Zellen wurde je $1 \mu\text{l}$ der biotinylierten Primärantikörper pro 1×10^8 Zellen zugegeben und bei 4°C für 15 Minuten unter leichter Agitation inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

<i>Antikörper</i>	<i>Zielzellen</i>
anti-Maus CD4	CD4 T-Lymphozyten
anti-Maus CD11b	Makrophagen
anti-Maus CD45R/B220	B-Zellen
anti-Maus CD49b/Pan-NK cells	natürliche Killerzellen
anti-Maus TER-119/erythroid cells	Erythrozyten
anti-Maus IgG	B-Zellen
anti-Ratte IgG	Bindung an obige aus der Ratte stammende anti-Maus Antikörper

Anschließend wurde mit 10 ml BSS/BSA gewaschen und wieder auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. Die Suspension wurde mit Streptavidin-gekoppelten Microbeads im Verhältnis 1:20 bei 4°C für 20 min inkubiert, wobei nach 10 min leicht geschüttelt wurde. Danach wurde erneut mit 10 ml BSS/BSA gewaschen und das Pellet in 1 ml BSS/BSA resuspendiert.

Die MACS-Säule (Miltenyi Biotech) wurde mit BSS/BSA gewaschen und im Magnetfeld platziert. Anschließend wurde die Zellsuspension appliziert und das Eluat mit der Negativfraktion der unmarkierten CD8⁺ T-Lymphozyten aufgefangen.

Danach wurde die Säule dreimal mit 1 ml BSS/BSA gespült. Die magnetisch gekoppelten irrelevanten Zellen konnten nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mit BSS/BSA ausgespült werden.

Die Suspension mit den gewünschten OT-I Zellen wurde erneut mit BSS/BSA gewaschen und die Zellzahl in einer Neubauerkammer bestimmt.

3.6.2 Kontrolle des Reinheitsgrades der Zellseparation

Die Reinheit der für FACS-Färbungen, Proliferationsassays und Zytokin-ELISAs benötigten CD8⁺ T-Zellen wurde nach der immunmagnetischen Separation per FACS-Analyse überprüft. Hierfür wurde auf CD4, CD8 und auf die beiden Ketten V α 2 und V β 5 des transgenen T-Zell Rezeptors gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Der Anteil der CD4⁻CD8⁺V α 2⁺V β 2⁺ Zellen betrug durchschnittlich 94 %.

3.7 Radioaktiver Proliferationsassay

Um die Proliferationsrate von OT-I Zellen in Anwesenheit des Peptids SIINFEKL und unterschiedlicher Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers 25-D1.16 zu bestimmen, wurden radioaktive Proliferationsassays durchgeführt.

3.7.1 Festlegung der SIINFEKL-Konzentration für die OT-I Zell-Stimulation

Zuvor wurde in einem FACS-Titrationsassay die Peptidkonzentration für die Stimulation der OT-I Zellen festgelegt. Um einen blockierenden Effekt von 25-D1.16 auf die Proliferation der T-Zellen nachzuweisen, musste eine optimale SIINFEKL-Konzentration gefunden werden, bei der sich die Zellen nicht mit maximaler Proliferationsrate vermehren.

Hierzu wurde per FACS-Analyse die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 bei durch verschiedene Peptid-Konzentrationen stimulierten OT-I Zellen untersucht.

Aus OT-I transgenen Mäusen isolierte CD8⁺ T-Lymphozyten wurden hierfür 24 Stunden mit unterschiedlichen SIINFEKL-Konzentrationen stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung mit einem FITC-konjugierten anti-CD69-Antikörper. IgG₁-Maus-Isotyp-Standard wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Die Messung im FACS-Gerät ergab den stärksten Abfall der CD69 Expression bei einer Peptidkonzentration von 2,5 ng/ml. Bei dieser Konzentration war daher davon auszugehen, dass die OT-I Zellen eine submaximale Proliferationsrate aufweisen und damit einen für folgende Versuche optimalen Aktivierungszustand.

3.7.2 Zytostatische Behandlung / Bestrahlung Antigen-präsentierender Zellen zur Hemmung ihrer Proliferation

Für einen Teil der Proliferationsassays wurde ein transfizierter Klon der EL4 Zellreihe, der Ovalbumin exprimiert, sog. EG.7-OVA Zellen verwendet. Sie dienten als Antigen-präsentierende Zellen. Diese EG.7-OVA Zellen, ebenso wie die Kontroll-Zelllinie EL4 wurden mit 50 Gray bestrahlt, um die Verfälschung der Proliferationswerte der OT-I Zellen zu verhindern. Die radioaktive Strahlung führt zu DNA-Strangbrüchen und damit zum Stopp der Zellteilung.

Alternativ wurden die Zellen mit dem alkylierenden Chemotherapeutikum Mitomycin C behandelt. Mitomycin C führt ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen sowie zu Quervernetzungen von komplementären DNA-Strängen. Maximal 5×10^6 Zellen/ml in RPMI oder BSS wurden mit 50 µg/ml Mitomycin C versetzt. Sie wurden bei 37°C 30-40 min inkubiert und alle 10 min sanft geschüttelt. Danach wurden die Zellen 3-4 Mal mit BSS oder RPMI + FCS/SC gewaschen.

3.7.3 Durchführung der Proliferationsassays

OT-I Zellen wurden aus 6-8 Wochen alten OT-I transgenen Mäusen mittels immunmagnetischer Separation isoliert. Teilungsunfähige EG.7-OVA Zellen

dienten als Antigen-präsentierende Zellen und EL4 Zellen, ebenfalls teilungsunfähig, als Kontroll-Zelllinie.

Zellen in definierter Zellzahl (5×10^4 OT-I Zellen/well, 1×10^4 EG.7-OVA Zellen/well, 1×10^4 EL4 Zellen/well), stimulierendes Peptid SIINFEKL ($c = 2,5$ ng/ml) und der Antikörper 25-D1.16, bzw. die Isotypkontrolle PPV06 (in absteigender Konzentration, 1:10 Verdünnungsreihe) wurden in 96-well-Platten pipettiert. Als Medium diente RPMI+ 10% FCS. Das Gesamtvolumen pro well betrug $200 \mu\text{l}$.

Die 96-well-Platten wurden über einen Zeitraum von 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Anschließend wurden aus jedem Napf $125 \mu\text{l}$ Überstand für den IFN- γ -ELISA entnommen, in eine zweite 96-well-Platte überführt und tiefgefroren.

Die Platten für den Proliferationsassay wurden mit $125 \mu\text{l}$ RPMI+ 10% FCS pro Napf aufgefüllt, danach wurde $50 \mu\text{l}$ radioaktives [^3H] Thymidin in RPMI ($c = 10 \mu\text{Ci/ml}$) zugegeben, sodass die endgültige Thymidin-Konzentration in den Nöpfen $2,5 \mu\text{Ci/ml}$ betrug. Die Platten wurden für 16 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO_2 gelassen.

3.7.4 Auswertung mittels automatisiertem Harvester

Nach 16 Stunden Thymidin-Einbauzeit wurde der Inhalt der 96-well-Platten mittels Betaplate Harvester nach den Herstellerangaben auf 96-Loch Glasfaserfilter (Printed Filtermat A, Wallac Oy) übertragen. Diese Filter wurden im Ofen bei 50°C für 30 min getrocknet und nach Zugabe von 5 ml Betaplate-Szintillationsflüssigkeit in spezielle Folie (sample bags) eingeschweißt.

Die Messung des radioaktiven Zerfalls des von proliferierenden Zellen in neu gebildete DNA eingebauten [^3H] Thymidins erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler. Der radioaktive Zerfall wurde von dem Computerprogramm MicroBeta Systems der Firma Wallac als Zerfälle pro Minute (cpm = counts per minute) angegeben. Diese Größe ist der Proliferationsrate der Zellen direkt proportional.

3.8 IFN- γ -ELISA

Im Anschluss an oben beschriebene Proliferationsassays wurde mit den entnommenen Überständen ein Zytokin-ELISA durchgeführt, bei dem die IFN- γ Produktion der OT-I Zellen in Anwesenheit von 25-D1.16 bzw. der Isotypkontrolle PPV06 bestimmt wurde. Die Zytokin-ELISAs wurden nach der Sandwich-Methode durchgeführt. Hierfür wurde ein von BD Biosciences erworbenes IFN- γ Kit verwendet, welches einen Antikörper (Capture Antibody) zum Beschichten der Platte (96-well Nunc-Platten), einen zum Detektieren (Detektor), eine Peroxidase (Enzym) und einen Standard enthält.

Als erster Schritt wurde eine Mikrotiterplatte im 96-well-Format beschichtet. Hierfür wurde der Primärantikörper anti-Maus IFN- γ 1:250 in Coating Puffer verdünnt. Die 96-well-Platte wurde mit 100 μ l pro Napf beschichtet. Über Nacht erfolgte bei 4°C die Adsorption des Antikörpers an die Platte.

Ungebundener Primärantikörper wurde durch 5-maliges Waschen mit Waschpuffer (\geq 300 μ l/well) abgespült.

Freie Proteinbindungsstellen wurden durch Zugabe von 200 μ l Blocking-Puffer/well für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur abgeblockt. Währenddessen wurden Standardreihe und Proben vorbereitet. Standardreihe: rekombinantes Maus-Zytokin IFN- γ ; höchste Konzentration 2000 pg/ml, 1:2 Verdünnungsreihe, niedrigste Konzentration 31,3 pg/ml. Nach erneutem Waschen der Mikrotiterplatte wurden je 100 μ l der Standards, Proben und Kontrollen aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Detektionsantikörper (biotinylierter anti-Maus IFN- γ) wurde 1:250 in PBS⁻/10%FCS verdünnt. 15 min vor Gebrauch wurde das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) im Verhältnis 1:250 zur Sekundärantikörper-Lösung zugegeben.

Die Platten wurden mit Waschpuffer gewaschen, bevor 100 μ l / well des Gemisches aus Detektionsantikörper und Enzym aufgetragen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Nach diesem Schritt wurde 10x gründlich gewaschen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l der colorimetrisch detektierbaren Substratlösung / well

(TMB/H₂O₂ = Tetramethylbenzidine/Wasserstoffperoxid) gestartet. Die Platten wurden ca. 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Sobald sich in der Standardreihe eine schön abgestufte Blaufärbung zeigte, wurde die Farbreaktion durch 50 µl Stopplösung (1 M H₃PO₄) pro Napf gestoppt.

Die Extinktion des bis zu diesem Zeitpunkt gebildeten Produktes wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

Mit dem Programm Microsoft Excel wurde anhand der Extinktionen der Standards bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt. So konnten anschließend die Zytokinkonzentrationen der Proben ausgerechnet werden.

3.9 Versuche mit OT-I und ODC-OVA transgenen und ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen

3.9.1 Haltung transgener Mäuse

Die Versuchstiere wurden in einer SPF-Anlage (spezifiziert pathogenfrei) gemäß gültigen Tierschutzrichtlinien in Käfigen von maximal 5 ausgewachsenen Tieren gepflegt. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden.

Sie erhielten artgerechtes Futter und freien Zugang zu Trinkwasser.

Die Öffnung der Käfige für Antikörper-Injektion, Beobachtung und Gewichtskontrolle erfolgte ausschließlich unter der Sterilbank.

3.9.2 Antikörper-Gabe in vivo

Der aus Hybridomzellen isolierte Antikörper 25-D1.16 wurde nach Konzentrierung, Reinheitskontrolle mittels SDS-Page und Funktionskontrolle mittels FACS-Titration (siehe Kap. 4.2) für die Verwendung bei in vivo-Versuchen mit Hilfe einer Filtereinheit (Porenweite 0,2 µm) sterilisiert.

Potentiell ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen wurden am siebten Lebenstag 100 µg, 200 µg oder 500 µg des Antikörpers einmalig verabreicht. Die Injektion erfolgte intraperitoneal.

Anschließend wurden die Tiere jeden Tag beobachtet. Es wurden EAE-Krankheitsstadium und Körpergewicht bestimmt.

3.9.3 Gewebeentnahme und Fixierung

Mit 25-D1.16 behandelte Mäuse wurden entweder im EAE-Stadium 4 ohne Besserungstendenz oder bei Versuchsende mit CO₂ getötet. Ein kleines Stück Schwanz wurde für die PCR zur Genotypisierung verwendet. Es folgte die Eröffnung von Bauchraum und Thorax für die Entnahme von Thymus und Milz, die in 5 ml BSS/BSA aufbewahrt wurden. Anschließend wurde der rechte Ventrikel des Herzens punktiert und Blut abgezogen. Zum Schluss wurden Gehirn und Rückenmark zügig entnommen und in 4 % Paraformaldehyd eingelegt.

Bei älteren Tieren wurde die Perfusionsfixierung angewendet. Vor der Gewebeentnahme wurden ihnen 400 µl eines Anästhetika-Gemisches (500 µl Ketaminhydrochlorid und 200 µl Xylazinhydrochlorid in 5,5 ml PBS) intraperitoneal injiziert. Nach Entnahme von Schwanz, Thymus und Milz wurde der linke Ventrikel punktiert und ein Perfusor mit PBS in das Gefäßsystem eingebracht. Die Vena cava superior wurde durchgetrennt. Nach dem Ausbluten wurde der Perfusor auf 4 % Paraformaldehyd umgestellt. Auf diese Weise wurden die Organe fixiert. Dann wurden Gehirn und Rückenmark herauspräpariert und in Formaldehyd aufbewahrt.

Bereits in situ fixierte Organe können schon nach 2-3 Stunden in 4 % Paraformaldehyd in PBS überführt werden, nicht fixierte Organe werden über Nacht bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd vollständig fixiert.

Die Weiterverarbeitung von Schwanz, Milz, Thymus und Blut ist in Kap. 3.3 und Punkt 3.10 dargelegt.

3.9.4 Einbettung in Paraffin

Nach der Fixierung wurden Gehirn und Rückenmark voneinander getrennt. Das Gehirn wurde entlang der Falx cerebri in zwei Hälften geschnitten, wobei eine Hälfte noch einmal geviertelt wurde. Das Rückenmark wurde in Zervikal-, Thorakal- und Lumbalmark zerlegt, die wiederum jeweils in drei Teile geschnitten wurden.

Die Gewebeteile wurden in Kassetten gelegt und konnten in PBS ca. 1 Woche aufbewahrt werden.

Das Einbetten in Paraffin erfolgte über Nacht in einer Einbettmaschine (Citadel 1000 Wax Bath, Thermo Electron Corporation). Hier wurden die Präparate zunächst mittels aufsteigender Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol, je 20 min) entwässert, bevor sie zweimal für je 30 min in ein Ethanol-Chloroform-Gemisch (100% Ethanol : Chloroform = 1 : 1) und zweimal für je 30 min in Chloroform absolut getaucht wurden. Zum Schluss wurden sie in Paraffin überführt (Paraffin I, 50 min und Paraffin II, 30 min). Danach wurden die paraffinierten Objekte aufgeblickt. Die Einbettmaschine wurde freundlicherweise vom histologischen Labor der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

3.9.5 Herstellung der Gewebeschnitte und Beschichten von Objektträgern

Die Gewebeschnitte wurden an einem manuellen Schlittenmikrotom angefertigt. Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke mit den Gewebeproben für 1 Stunde im Gefrierschrank gekühlt. Die Schnittdicke betrug 5 µm.

Die fertigen Schnitte wurden in einem ca. 40°C warmen Wasserbad aufgefangen und gestreckt, bevor sie auf Objektträger übertragen und bei 37°C für 48 Stunden getrocknet wurden.

3.9.6 Histologie der Gehirn- und Rückenmarksschnitte

Zur Beurteilung der EAE-Entzündungsaktivität im Zentralnervensystem der mit 25-D1.16 behandelten Tiere wurden verschiedene histologische und immunhistologische Färbungen der Gewebeschnitte durchgeführt.

3.9.6.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Hämatoxylin färbt Zellkerne blau-violett, durch Eosin werden Zytoplasma, Bindegewebe und Interzellularräume nuanciert rot dargestellt. Die H.E. Färbung diente hier als Übersichtsfärbung.

Die Paraffinschnitte wurden durch zwei Xylolschritte zu je 10 min entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 99%, 96%, 70%, je 2 x 2 min)

hydriert. Nach einem kurzen Waschschrift in destilliertem Wasser wurden die Schnitte 10 min in Hämatoxylin gefärbt. Anschließend wurde 10 min lang unter fließendem Wasser gespült. Im Anschluss an die nachfolgende Färbung mit Eosin für 7 min wurde noch einmal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor die Gewebeschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 99%, je 2 x 2 min) und Xylol (2 x 10 min) entwässert wurden. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt und getrocknet.

3.9.6.2 Immunhistochemische Färbungen (CD3, Mac-3)

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen im histologischen Schnitt sichtbar zu machen.

Zur Differenzierung der EAE-Entzündungsinfiltrate wurden hier immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker von T-Zellen (CD3) und Macrophagen/Mikroglia (Mac-3) durchgeführt.

Bei der eingesetzten indirekten Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Dann wird ein zweiter Antikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und löst mit einer Enzym-Substrat-Reaktion die Farbentstehung aus.

Während des gesamten Färbeprozesses müssen die Präparate feucht bleiben. Zur Sicherstellung, dass die Flüssigkeit nicht von den relevanten Bereichen auf den Objektträgern abfließt, wurden diese Bereiche mit einem hydrophoben Markerstift (Liquid Blocker) als Flüssigkeitsbarriere ummalt.

Alle Inkubationszeiten fanden in einer feuchten Kammer statt.

Im Folgenden wird das verwendete Protokoll der CD3 und Mac-3 Färbung nach ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode beschrieben.

Die Paraffinschnitte wurden 2 x 10 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 99%, 96%, 70% je 2 x 2 min) hydriert und in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte zusammen mit Siedesteinchen 30 min lang in 10 mM Citratpuffer (pH = 6,0) in der Mikrowelle gekocht. Durch

langsamen Zufluss von kaltem Leitungswasser wurden die Schnitte abgekühlt und anschließend jeweils 4 x in destilliertem Wasser und PBS gewaschen.

Potenzielle unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch 10% BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert.

Anschließend erfolgte die Detektion des Antigens durch Inkubation mit dem Primärantikörper (Ratte anti-Maus CD3 (Serotec) für die Färbung der T-Zellen, Ratte anti-Maus Mac-3 (BD Biosciences) für die Makrophagen/Mikrogliafärbung) über Nacht bei 4°C. Die Primärantikörper wurden dabei 1:200 in 1% BSA in PBS verdünnt.

Nach dreimaligem Spülen der Schnitte in PBS erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit POD-Block für 13 min bei Raumtemperatur. Es wurde erneut 3 x in PBS gewaschen, bevor die Primärantikörper mit dem ABC-System detektiert wurden. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Biotin anti-Ratte IgG (H+L), Verdünnung 1:200 in 1 % BSA in PBS) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 3 x in PBS gewaschen und anschließend mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (1:100, verdünnt in PBS) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Färbesubstrat für die Peroxidasereaktion diente 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB). Dieses wurde zuvor in PBS und 3 % H₂O₂ gelöst und filtriert. DAB wurde ca. 10 min unter genauer Beobachtung auf den Schnitten belassen.

Die an den Avidin-Biotin-Komplex gekoppelte Peroxidase überträgt Elektronen von DAB auf das zugegebene Substrat Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das so zu Wasser reduziert wird. DAB fällt als unlösliches, bräunliches Produkt aus.

Nach zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 40 sec bis 1 min im Falle der CD3 Färbung, bzw. für 1,5 min bei der Mac-3 Färbung. Anschließend wurde 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 99%, je 2 x 2 min) dehydriert, für 2 x 2 min in Xylol gegeben und zum Schluss mit Entellan eingedeckelt wurden.

3.9.6.3 Luxol Fast Blue- und PAS-Färbung

Um das Ausmaß der Demyelinisierung zu bestimmen, wurden die Schnitte des Zentralnervensystems mit Luxol Fast Blue und PAS gefärbt. Aufgrund der Affinität von Luxol Fast Blue (LFB) zu dem im Myelin enthaltenen Neurokeratin können so myelinisierte Fasern dargestellt werden.

Nach Entparaffinierung in Xylol (2 x 10 min) und Hydrierung in Ethanol (99% und 96%, je 2 x 2 min) wurden die Schnitte in 0,1 % Luxol Fast Blue-Lösung transferiert und bei 56 °C über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde kurz in 96% Ethanol und destilliertem Wasser gewaschen, bevor die Gewebeschnitte zur Differenzierung für 30 bis 60 Sekunden in 0,1 % Lithiumcarbonat gegeben wurden. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 20 Sekunden in 70% Ethanol getaucht und in destilliertem Wasser gesammelt. Zur Gegenfärbung erfolgte eine PAS-Färbung indem die Schnitte für 10 min in 1% Perjodsäure gegeben, mit destilliertem Wasser gewaschen und für 20 min in Schiff'sches Reagenz überführt wurden. Im Anschluss daran wurde 3 x 2 min mit einer Sulfid-Waschlösung gewaschen und 10 min unter fließendem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 99%, je 2 x 2 min) und zwei Xylolschritte zu je 10 min dehydriert und mit Entellan eingedeckelt.

3.10 Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR

3.10.1 Präparation genomischer DNA

Die für die in vivo Versuche mit dem Antikörper 25-D1.16 verwendeten Tiere wurden mittels PCR genotypisiert.

Als Template für nachfolgende PCR-Reaktion wurde genomische DNA aus einem Schwanzstück oder aus dem Blut der Mäuse extrahiert.

Hierfür wurden 500 µl Lysepuffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Ein 1 cm langes Schwanzstück der Mäuse, bzw. das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde hinzugefügt und bei 56 °C in einem Schüttler über Nacht verdaut. Anschließend wurde der Inhalt des Röhrchens kurz mit einem Vortexer vermischt. Nach Zentrifugation für 10

min bei 14000 rpm und 4°C wurden 500 µl 100% Isopropanol zugegeben und der Ansatz durch mehrfaches Umwenden gründlich gemischt. Das DNA-Präzipitat wurde mit der geschmolzenen Spitze einer Glas-Mikropipette entnommen und kurz in 70% Ethanol getaucht. Nach 1 min Antrocknen wurde die DNA in 200 µl destilliertes Wasser überführt und über Nacht bei 56 °C wieder in Lösung gebracht.

3.10.2 Amplifikation der DNA mittels PCR

Für die PCR-Reaktion wurde das Panscript-DNA-Polymerases-Kit^R verwendet. 10x Puffer, MgCl₂ und Polymerase waren in den entsprechenden Verdünnungen im Kit enthalten.

Die Primer wurden jeweils mit soviel destilliertem Wasser gelöst, dass sich eine Stock-Konzentration von 10 pmol ergab.

Es wurde für jede Probe folgende Lösung in einem Eppendorf-Röhrchen hergestellt (auf Eis):

- 2 µl 10x Puffer
- + 0,8 µl MgCl₂
- + 0,4 µl dNTPs
- + 1 µl Vorwärtsprimer (10 pmol)
- + 1 µl Rückwärtsprimer (10 pmol)
- + 1 µl DMSO
- + 12,7 µl destilliertes Wasser
- + 0,1 µl Taq-Polymerase

Nach Zugabe von 1 µl DNA-Template (genomische DNA, s.o.) wurden die Röhrchen in den vorgeheizten PCR-Cycler (T3 Thermocycler, Biotron) gegeben. Folgende Einstellungen wurden gewählt:

94 °C 4 min
┌
└

94 °C 1 min
35x 66 °C 1 min (annealing)
72 °C 1 min (extension)
72 °C 5 min
4 °C

Das PCR-Produkt wurde im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

3.10.3 Auftrennung der DNA mit Agarose-Gel-Elektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden unter Gleichspannung in 1,2 %igen Agarose-Gelen horizontal aufgetrennt.

Für die Herstellung des Gels wurden 0,48 g Agarose in 40 ml TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Zur Visualisierung der DNA wurde dieser Lösung 1 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Diese Substanz interkaliert in DNA und leuchtet unter UV-Bestrahlung.

Das fertige Gel wurde in TBE-Laufpuffer gelegt. Zu jeder Probe wurden 5 µl Farbmaler (Probenpuffer) gegeben. Anschließend wurden die Taschen des Gels mit je 7 µl (kleine Taschen), bzw. 20 µl der Proben (große Taschen) beladen. Als Größenstandard wurden 2 µl einer 1 kb-DNA-Leiter (GeneRuler™, Fermentas) aufgetragen.

Zuletzt wurde eine konstante elektrische Spannung angelegt, je nach Größe der Elektrophoresekammer 90 V oder 150 V. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel entnommen, unter einer UV-Lampe betrachtet und fotografiert.

3.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur Auswertung und graphischen Darstellung von Daten wurden die Programme Excel (Microsoft), Prism (Graph Pad), Photoshop (Adobe), Illustrator (Adobe), MicroBeta Workstation (Wallac Oy) und Cell Quest (BD Biosciences) verwendet.

Die Messwerte sind als Mittelwerte angegeben. Als Fehlermaß wurde die Standardabweichung verwendet. Signifikanzprüfungen wurden mit Prism durchgeführt (student t-test).

Abbildungen und Schemata wurden mit Illustrator (Adobe) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung des monoklonalen Antikörpers 25-D1.16 aus Kulturüberstand

Um die Effekte des Antikörpers 25-D1.16 auf die Aktivierung der OT-I Zellen *in vitro* und *in vivo* untersuchen zu können, galt es zunächst, den Antikörper zu isolieren. Er wurde aus dem Kulturüberstand einer Hybridom-Zelllinie (durch Fusion mit Myelomzellen immortalisierte antikörperproduzierende B-Lymphozyten) affinitäts-chromatographisch über Protein G aufgereinigt. Zur Kontrolle der Reinheit der Präparation wurde der Antikörper mittels SDS-PAGE analysiert und mit einem kommerziell produzierten Antikörper (D665) verglichen. Abb. 4.1 zeigt die Coomassie-Färbung des Gels zur Visualisierung der Proteinbanden. 25-D1.16 und D665 weisen jeweils zwei Banden auf, welche der leichten, bzw. der schweren Kette der Antikörper entsprechen. Die Bandenaufspaltung entsteht wahrscheinlich durch verschiedengradige Glykosylierung und wurde bei beiden Antikörpern beobachtet. Signifikante Verunreinigungen von 25-D1.16 durch Proteine anderen Molekulargewichts sind auf dem Gel nicht zu erkennen.

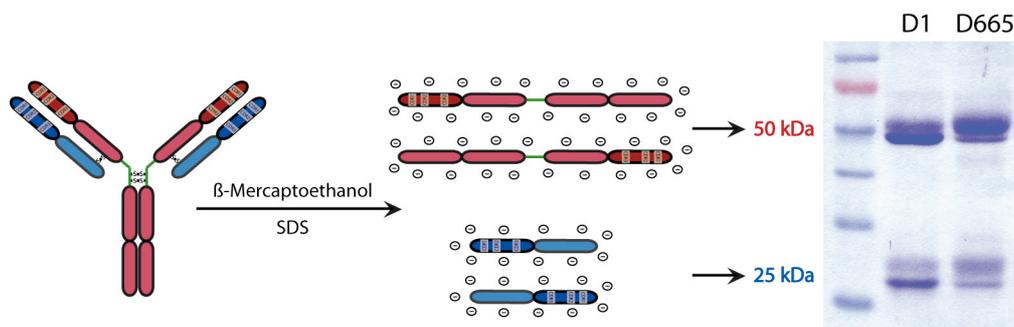


Abb. 4.1 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE von 25-D1.16 und D665. Rechts im Bild ist das Gel nach Coomassie-Färbung gezeigt. Der kommerziell hergestellte Antikörper D665 (rechte Spur) diente als Kontrolle. Als Proben wurden jeweils 5 µg 25-D1.16 und D665 unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen auf einem 10%igen Gel aufgetragen. Links ist ein Größenmarker auf das Gel geladen.

Beide Antikörper zeigen 2 Banden, deren Molekulargewichte (50 kDa und 25 kDa) denen der schweren, bzw. leichten Kette eines Antikörpers entsprechen. Die Aufspaltung der Banden entsteht wahrscheinlich durch unterschiedliche Glykosylierung. Die Präparation des Antikörpers 25-D1.16 enthält keine sichtbaren Verunreinigungen.

Links im Bild: schematische Zeichnung der Reduktion der Disulfidbrücken eines IgG-Antikörpers durch β-Mercaptoethanol sowie der Auflösung der höheren Proteinstrukturen durch SDS. Es entstehen negativ geladene, linearisierte Proteine. Farbkodierung: rot = schwere Kette, blau = leichte Kette.

4.2 Nachweis der Erkennung des Octapeptid-MHC-I-Komplexes durch 25-D1.16 mittels FACS-Analyse und fluoreszenzmikroskopischer Analyse

4.2.1 FACS-Analyse

Um nachzuweisen, dass der aufgereinigte monoklonale Antikörper 25-D1.16 an den Komplex aus MHC-I-Molekül und dem Ovalbumin-Peptid SIINFEKL bindet, wurde zunächst eine FACS-Analyse durchgeführt.

Hierzu wurde die Thymom-Zelllinie EL4 (siehe Kap. 2.7) aus C57BL/6 Mäusen verwendet.

Diese EL4 Zellen wurden mit SIINFEKL inkubiert. Dadurch wird ein Teil der auf der Zelloberfläche exprimierten H-2K^b-Proteine von außen mit dem Peptid beladen. Durch den angebotenen SIINFEKL-Überschuss findet eine direkte Bindung des Peptids an die zellständigen MHC-I-Komplexe statt im Austausch gegen endogene Peptide.

Abbildung 4.2 zeigt auf der linken Seite eine FACS-Färbung unbeladener EL4 Zellen, die der FACS-Färbung von mit SIINFEKL beladenen EL4 Zellen gegenüber gestellt wurde (rechts).

Die rote Linie repräsentiert 25-D1.16. Als Negativkontrolle diente ein Standard Antikörper der Maus gleicher Subklasse (IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle, gegen ein Antigen nicht tierischer Zellen gerichtet und daher bindungsunfähig, dunkelblaue Linie im Histogramm). Positivkontrolle war ein anti-H-2K^b Antikörper (siehe Kap. 1.2.3), der alle K^b-Proteine erkennt, unabhängig davon, welches Peptid sie gebunden haben (hellblaue Linie).

Für alle primären Antikörper wurde ein PE-konjugierter Sekundärantikörper verwendet.

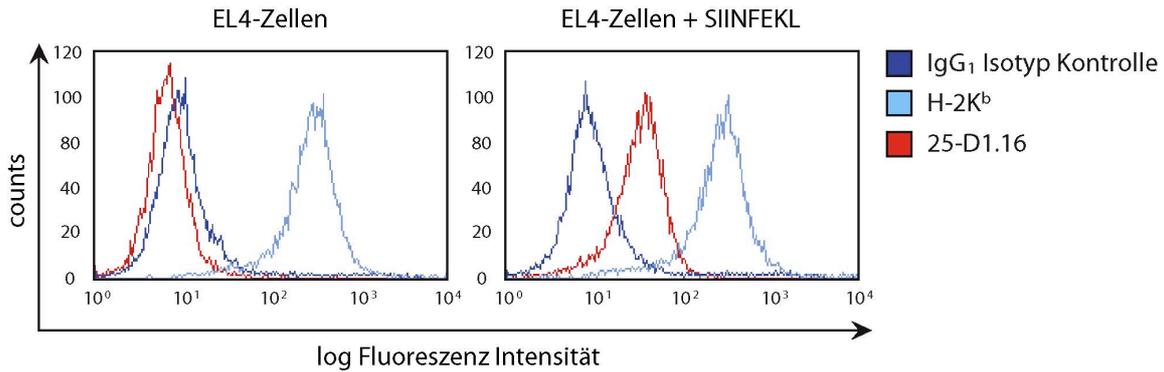


Abb. 4.2 25-D1.16 detektiert OVA-8:H-2K^b Komplexe auf der Oberfläche von mit SIINFEKL inkubierten EL4 Zellen. FACS-Färbung: Antikörper 25-D1.16 (rote Linie), IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle (dunkelblau), Positivkontrolle anti-H-2K^b (hellblau). PE-konjugierter Sekundär-Antikörper. 25-D1.16 bindet nicht unspezifisch an reine EL4 Zellen (links), sondern erkennt spezifisch den H-2K^b:SIINFEKL-Komplex auf der Oberfläche von EL4 Zellen, die mit dem Peptid (1 µg/ml) für 1,5 Stunden inkubiert wurden (rechts).

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass 25-D1.16 sich in seinem Bindungsverhalten bei unbeladenen EL4 Zellen nicht von der Negativkontrolle unterscheidet. Bei SIINFEKL-beladenen EL4 Zellen jedoch zeigt sich eine deutliche Rechtsverschiebung der zugehörigen Kurve in der FACS-Färbung. Der Antikörper bindet also nicht unspezifisch an Strukturen auf der Oberfläche von EL4 Zellen, sondern erkennt selektiv MHC-I-Moleküle, welche SIINFEKL präsentieren. Da nicht alle K^b-Moleküle auf der Zelloberfläche mit diesem Peptid beladen sind, zeigt 25-D1.16 im Vergleich zur Positivkontrolle eine niedrigere Fluoreszenz Intensität.

Die Erkennung des OVA-8:H-2K^b Komplexes durch 25-D1.16 lässt sich titrieren (siehe Abbildung 4.3). Für die dargestellte FACS-Analyse wurden EL4 Zellen mit SIINFEKL beladen, mit einer Verdünnungsreihe des Antikörpers 25-D1.16, bzw. einer Isotyp-Kontrolle inkubiert und anschließend mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt. Auf der x-Achse des Diagramms ist die Konzentration von 25-D1.16 in µg/ml, auf der y-Achse Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity) angegeben. Δ MFI wurde aus der Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität der mit 25-D1.16 markierten EL4 Zellen und des IgG₁-Maus-Isotyp-Standards errechnet. Unter dem Diagramm sind exemplarisch einzelne Histogramm-Plot-Overlays zu der jeweiligen Antikörper-Konzentration gezeigt.

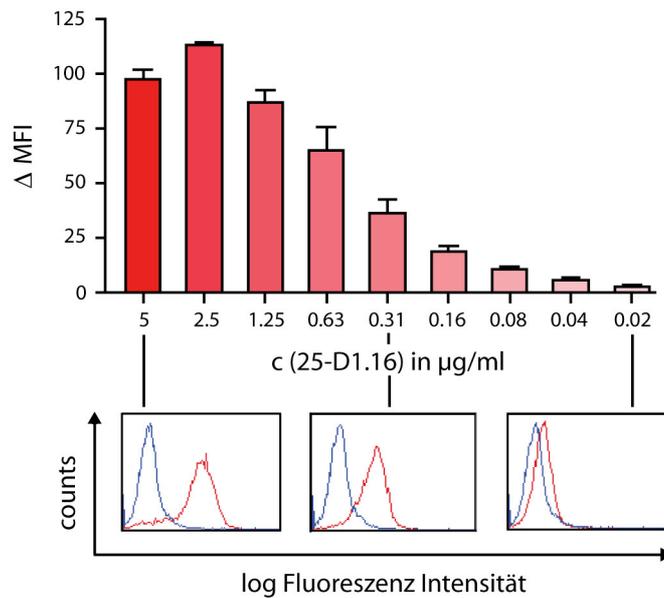


Abb. 4.3 Mit steigender Verdünnung von 25-D1.16 nimmt die Anzahl der durch den Antikörper markierten OVA-8:H-2K^b Komplexe ab. x-Achse: 25-D1.16-Konzentration in µg/ml. y-Achse: Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity). EL4 Zellen wurden mit 1µg/ml SIINFEKL für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 25-D1.16, bzw. mit der IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle und einem PE-konjugierten Sekundärantikörper. Unter dem Diagramm sind beispielhaft Original-FACS-Daten der jeweiligen 25-D1.16-Konzentration zu sehen. Je geringer die Konzentration von 25-D1.16, desto geringer die Anzahl der mit Antikörper markierten SIINFEKL:MHC-I-Komplexe. Farbkodierung: rot = 25-D1.16, blau = IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle.

Es zeigt sich, dass der Intensitätsunterschied zwischen 25-D1.16 und Kontrolle mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers immer geringer wird, da die Anzahl der durch 25-D1.16 markierten OVA-8:H-2K^b Komplexe abnimmt.

Durch diesen Versuchsaufbau wurde auch jede neu isolierte Charge Antikörper 25-D1.16 auf ihre Funktion überprüft.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Um die Bindung von 25-D1.16 an mit SIINFEKL beladene EL4 Zellen zu visualisieren, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Das Ergebnis zeigt folgende Abbildung aus der konfokalen Mikroskopie.

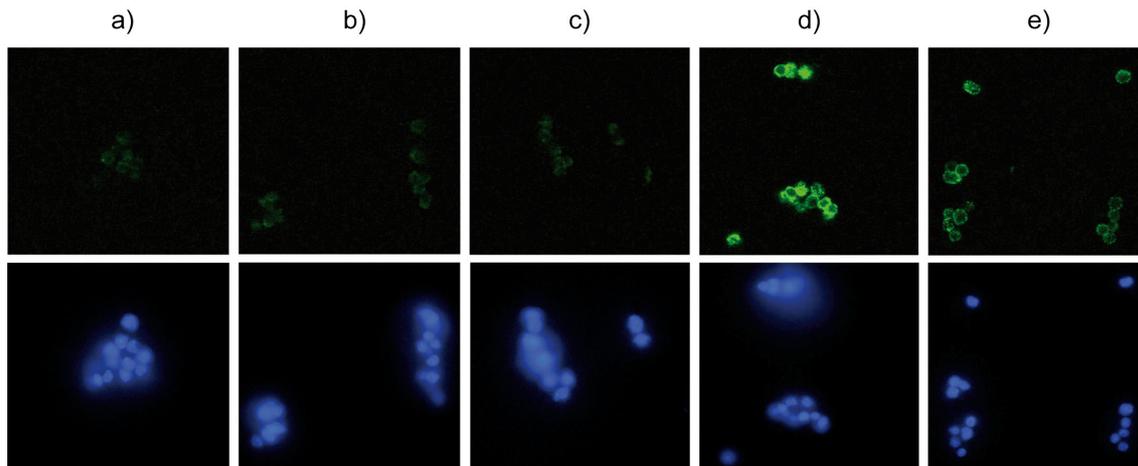


Abb. 4.4 Erkennung von OVA-8:MHC-I Komplexen auf mit SIINFEKL inkubierten EL4 Zellen durch 25-D1.16. In der oberen Zeile sind Immunfluoreszenz-Färbungen mit FITC-konjugiertem Anti-Mouse-IgG als Sekundärantikörper dargestellt. In der unteren Zeile sind die Zellkerne durch eine DNA-Färbung mit DAPI gezeigt. Zueinandergehörige Färbungen desselben Objektträgerausschnitts sind untereinander angeordnet.

a) EL4 Zellen ohne SIINFEKL wurden mit 25-D1.16 und dem Sekundärantikörper gefärbt. b)-e) EL4 Zellen wurden mit SIINFEKL inkubiert und b) nur mit dem Sekundärantikörper, c) mit IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle und Sekundärantikörper, d) mit H-2K^b als Positivkontrolle und Sekundärantikörper, e) mit 25-D1.16 und Sekundärantikörper gefärbt. Eine positive Immunfluoreszenz ließ sich nur für die Positivkontrolle und den Antikörper 25-D1.16 nachweisen.

Die Bildunterschrift gibt die verwendeten Antikörper an. In der oberen Zeile wurden die primären Antikörper jeweils mit einem grünfluoreszierenden Sekundärantikörper nachgewiesen. Des Weiteren wurde DNA mittels DAPI-Färbung markiert. Es konnten so die Zellkerne der EL4 Zellen bei Anregung mit ultraviolettem Licht ($\lambda = 360 \text{ nm}$) als blaue Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse sind in der unteren Zeile zu sehen. Zueinandergehörige Immunfluoreszenz und DAPI-Färbungen sind jeweils in vertikaler Anordnung dargestellt.

Für Gruppe a) wurden EL4 Zellen ohne vorherige Inkubation mit SIINFEKL mit 25-D1.16 und dem Sekundärantikörper gefärbt. Es wurde keine Immunfluoreszenz detektiert, was in Einklang mit der fehlenden Bindung des Antikörpers an unbeladene EL4 Zellen steht. Die Bilder b)-e) sind Aufnahmen von EL4 Zellen, deren MHC-I-Moleküle mit dem OVA-8-Peptid beladen wurden. b) zeigt die Färbung dieser Zellen mit dem Sekundärantikörper alleine. Auch hier war keine Immunfluoreszenz nachweisbar und eine unspezifische Bindung konnte somit ausgeschlossen werden. Auch mit der IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle ließ sich die Zellmembran erwartungsgemäß nicht anfärben (c), wohingegen die Positivkontrolle H-2K^b ein deutliches Signal lieferte (d). Die Färbung mit 25-

D1.16 (e) fiel ebenfalls deutlich positiv aus, wie in der FACS-Färbung jedoch etwas schwächer als die Positivkontrolle. So konnte der an der Zellmembran gebundene Antikörper 25-D1.16 sichtbar gemacht werden und es wurde bestätigt, dass er selektiv mit SIINFEKL beladene K^b-Proteine detektiert.

4.3 Interferenz des Antikörpers 25-D1.16 mit der durch exogen zugeführtes SIINFEKL initiierten Aktivierung von OT-I Zellen

Für diese Arbeit sollte zunächst in vitro geklärt werden, ob 25-D1.16 durch Bindung an OVA-8:H-2K^b-Komplexe die Antigenerkennung durch OT-I Zellen stören und im Sinne einer kompetitiven Inhibition die Aktivierung der OT-I Zellen verhindern kann.

Die dazu benötigten OT-I Zellen wurden aus den Lymphknoten 6-8 Wochen alter OT-I transgener BL/6 Mäuse mittels MACS (magnetic cell sorting) isoliert. Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch für alle weiteren Zelltrennungen die Überprüfung der Reinheit der OT-I Zellen per FACS-Analyse. Hierzu wurden die Zellen auf CD4, CD8 und die beiden Ketten des transgenen T-Zell-Rezeptors V α 2 und V β 5 gefärbt. Der Reinheitsgrad der isolierten Zellen betrug im Durchschnitt 94 %.

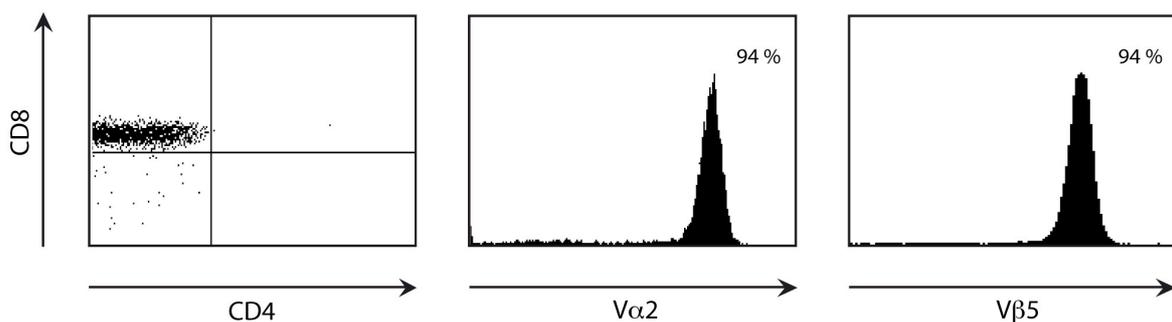


Abb. 4.5 Reinheitsgrad der aus Lymphknoten von OT-I transgenen BL/6 Mäusen immunmagnetisch separierten CD8⁺ Zellen. Die isolierten Zellen wurden für die FACS-Analyse auf CD4, CD8 und V α 2 Expression gefärbt. Zur doppelten Kontrolle erfolgte eine zweite Färbung mit anti-CD4, anti-CD8 und anti-V β 5. Der Prozentsatz der CD4-CD8+V α 2+V β 5+ Zellen betrug durchschnittlich 94%.

Alternativ wurden OT-I Zellen aus OT-I/RAG Mäusen (siehe Kap. 1.2.4.1 und Kap. 2.8) verwendet. Diese Tiere besitzen in den Lymphknoten einen durchschnittlichen OT-I Zellanteil von 95 %. Dementsprechend war hier keine Zellisolation nötig.

4.3.1 Expression von Aktivierungsmarkern durch SIINFEKL-stimulierte OT-I Zellen

Für die Stimulation der OT-I Zellen mit SIINFEKL musste zunächst eine optimale Peptid-Konzentration festgelegt werden, bei der die Zellen nicht maximal aktiviert werden. Dies ist nötig, um den Plateaubereich der Sättigungskurve zu verlassen und somit sensible Bedingungen für eine Blockade der Aktivierung zu erhalten. Auch hier wurde davon ausgegangen, dass man die membranständigen MHC-I-Moleküle der OT-I Zellen durch SIINFEKL artifiziell von außen mit diesem Peptid beladen kann. In diesem Versuchsaufbau sind die OT-I Zellen also gleichzeitig präsentierende und reagierende Zellen.

Mit FACS-Färbungen wurde nun die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 durch die mit verschiedenen Peptid-Konzentrationen stimulierten OT-I Zellen untersucht. CD69 ist ein sog. ‚early activation marker‘ (Testi et al., 1994), der in der frühen Phase der T-Zell Aktivierung vorübergehend exprimiert wird.

Die OT-I Zellen wurden mit verschiedenen SIINFEKL-Konzentrationen einen Tag lang stimuliert. Anschließend wurden Oberflächenfärbungen mit anti-CD69 durchgeführt. IgG₁-Maus-Isotyp-Standard wurde als Negativkontrolle mitgeführt. In Abbildung 4.6 ist die CD69-Expression der OT-I Zellen nach 24-stündiger Stimulation durch SIINFEKL zu sehen. Die Isotyp-Kontrolle ist alternierend zu den CD69-Messwerten angegeben.

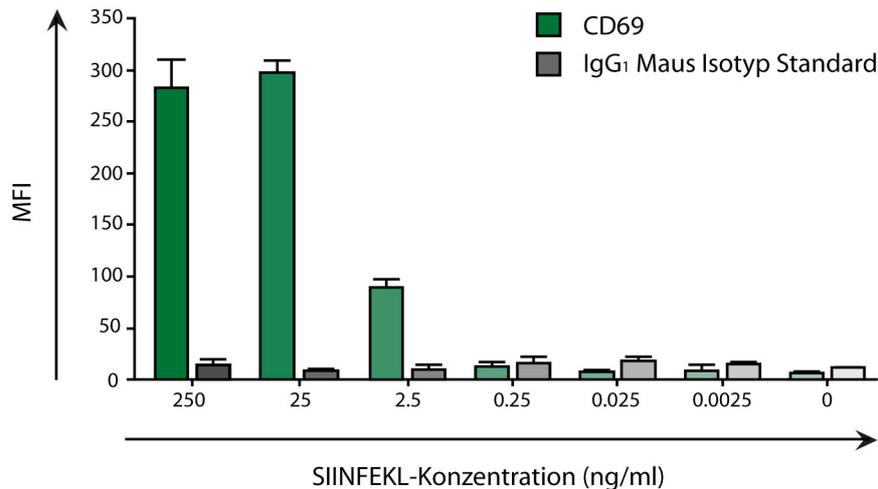


Abb. 4.6 Oberflächenfärbungen des Aktivierungsmarkers CD69 auf OT-I Zellen, die durch SIINFEKL stimuliert wurden. Die aus Lymphknoten von OT-I transgenen BL/6-Mäusen isolierten CD8 T-Zellen wurden mit anti-CD69 und als Kontrolle mit IgG₁-Maus-Isotyp-Standard gefärbt. Die Stimulationszeit betrug 24 Stunden. Die zugehörige Isotyp-Kontrolle ist alternierend zu den CD69-Messwerten im Diagramm angegeben. Auf der x-Achse ist die SIINFEKL-Konzentration, auf der y-Achse die MFI (Mittlere Fluoreszenz Intensität) aufgetragen. Während sich zwischen 250 ng/ml und 25 ng/ml kein signifikanter Unterschied der CD69 Expression zeigt (Plateauphase, Sättigungsbereich), findet hin zu 2,5 ng/ml ein deutlicher Abfall der Expression statt. Diese höchste der submaximal aktivierenden SIINFEKL-Konzentrationen wurde in allen folgenden Versuchen verwendet, da so submaximale und damit optimale Proliferationsraten erzielt werden können, die für die Untersuchung der Wirkung von 25-D1.16 nötig sind. Farbkodierung: grün = CD69; grau = IgG₁-Maus-Isotyp-Standard.

Eine hohe CD69 Expression spricht für eine starke Aktivierung der OT-I Zellen. Mit den beiden höchsten SIINFEKL-Konzentrationen lässt sich eine maximale Hochregulation des Aktivierungsmarkers erreichen. Es ist also bei Peptidkonzentrationen von mehr als 25 ng/ml eine Sättigung erreicht (Plateauphase), während hin zu 2,5 ng/ml ein deutlicher Abfall der CD69 Expression eintritt. 0,25 ng/ml und weniger stellen keinen ausreichenden Aktivierungsstimulus mehr dar. Entsprechend der Ergebnisse scheint eine Peptid-Konzentration von ca. 2,5 ng/ml ideal zu sein für die Stimulation der OT-I Zellen, da so im submaximalen Proliferationsbereich gearbeitet werden kann.

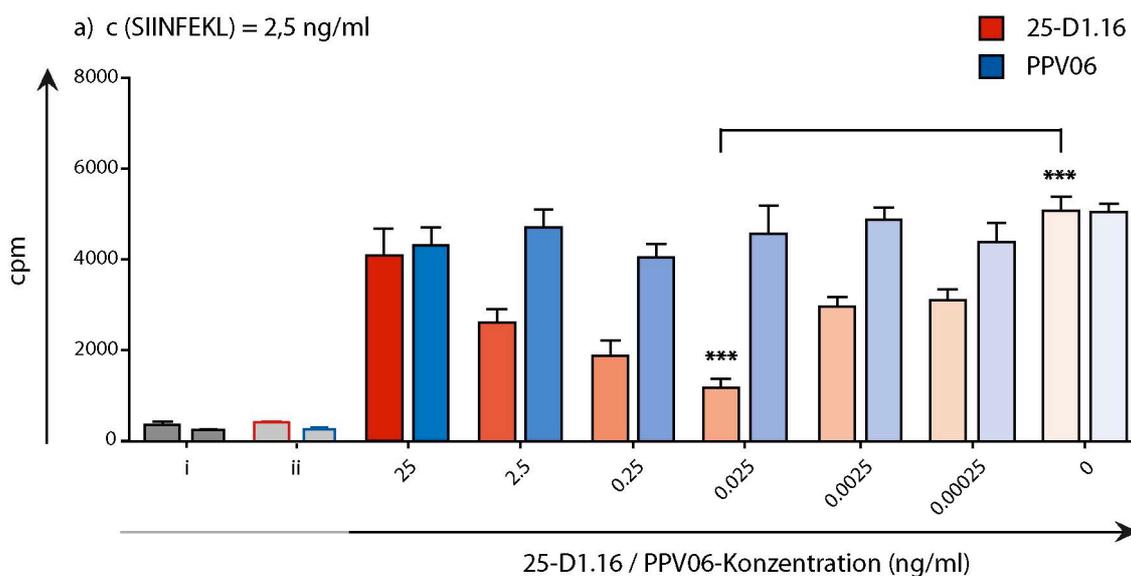
4.3.2 Proliferation Peptid-stimulierter OT-I Zellen in Anwesenheit des Antikörpers 25-D1.16

Zur Untersuchung der Frage, ob 25-D1.16 die Proliferation von OT-I Zellen durch Blockade der Antigenerkennung hemmen kann, wurden Proliferationsassays durchgeführt.

Nach der Aufreinigung wurden OT-I Zellen mit SIINFEKL stimuliert und in Kultur genommen. Um die in 4.3.1 ermittelte optimale Peptid-Konzentration zur T-Zell-

Aktivierung für die Proliferationsassays zu validieren, wurden erneut drei verschiedene SIINFEKL-Konzentrationen getestet. Jedem der drei Ansätze wurde 25-D1.16 in einer 1:10 Verdünnungsreihe zugegeben, wobei im Ansatz mit 2,5 ng/ml Peptid-Konzentration der IgG₁-Maus-Isotyp-Standard PPV06 als Negativkontrolle ebenfalls in absteigender Konzentration mitgeführt wurde. PPV06 bindet nicht an Säugetier-Zellen und sollte somit, egal in welcher Konzentration, keinen Einfluss auf die Zellproliferation haben.

Nach einem Tag wurde mit [³H] Thymidin gepulst. Dieses wird von proliferierenden Zellen in neu gebildete DNA eingebaut. Die beim radioaktiven Kernzerfall frei werdende β-Strahlung kann im β-counter gemessen werden und wird als „Zerfälle pro Minute“ (counts per minute = cpm) angegeben. Diese Größe ist direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 4.7 dargestellt.



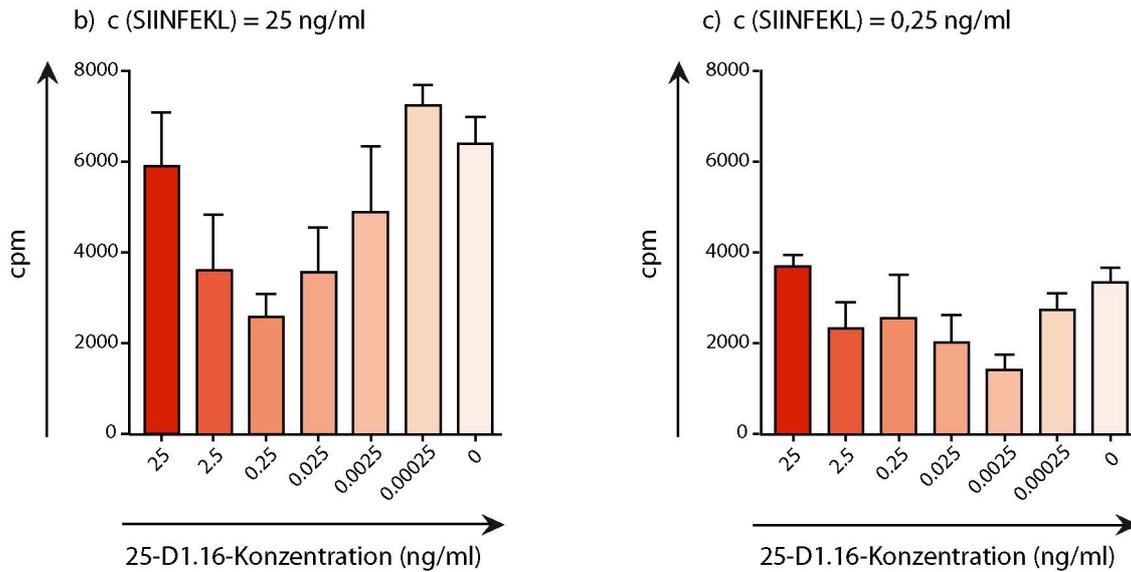


Abb. 4.7 Proliferation von OT-I Zellen in Anwesenheit von SIINFEKL und 25-D1.16. Die gereinigten OT-I Zellen (5×10^4 /ml) wurden mit 25 ng/ml (b), 2,5 ng/ml (a) und 0,25 ng/ml (c) SIINFEKL stimuliert. Die Peptid-Konzentrationen sind jeweils über den Diagrammen angegeben und gelten für den gesamten Ansatz. Jeder der drei Ansätze wurde außerdem mit einer Verdünnungsreihe des Antikörpers 25-D1.16 versetzt, wobei im Ansatz mit 2,5 ng/ml SIINFEKL-Konzentration PPV06 (IgG₁-Maus-Isotyp-Standard) als Negativkontrolle mitgeführt wurde (Diagramm a). Nach 24 Stunden wurde mit [³H] Thymidin gepulst. Nach 16-stündiger Einbauphase wurde die Proliferation im β -Counter analysiert. x-Achse: 25-D1.16- bzw. PPV06-Konzentration, die zugehörige Isotyp-Kontrolle in Diagramm a) ist alternierend zu den 25-D1.16-Messwerten aufgetragen. y-Achse: counts per minute. Kontrollen: i = OT-I Zellen ohne stimulierendes Peptid; ii = OT-I Zellen und 25-D1.16/PPV06 (25 ng/ml), ebenfalls ohne Stimulation. In Gegenwart von 25-D1.16 nimmt die Proliferation der OT-I Zellen auf bis unter 25% der maximalen Proliferationsrate ab. Die deutlichste Hemmung der Proliferation ergab sich dabei überraschenderweise nicht bei der höchsten, sondern bei mittlerer Antikörperkonzentration. *** = $p < 0,001$. Farbkodierung: rot = Titration von 25-D1.16; blau = Titration von PPV06.

Die SIINFEKL-Konzentrationen der Ansätze sind über den einzelnen Diagrammen angegeben und gelten für den gesamten Ansatz. Auf der x-Achse ist jeweils die Konzentration des Antikörpers 25-D1.16 aufgetragen. In Diagramm a) ist zusätzlich die zugehörige Negativkontrolle PPV06 alternierend zu den Messwerten bei 25-D1.16-Zugabe aufgetragen. Die y-Achse kennzeichnet den in counts per minute gemessenen radioaktiven Zerfall.

Die ersten vier Balken in Diagramm a) zeigen, dass OT-I Zellen ohne Stimulation durch SIINFEKL kaum proliferieren (i) und die Zugabe von 25-D1.16 oder PPV06 alleine keinen Effekt auf die Zellvermehrung hat (ii). Die restlichen Balken entsprechen der Proliferation der OT-I Zellen in Anwesenheit von absteigenden 25-D1.16- bzw. PPV06-Konzentrationen.

Von den drei getesteten SIINFEKL-Konzentrationen zeigte sich bei 2,5 ng/ml Peptidkonzentration die größte Beeinflussbarkeit der Proliferation der OT-I Zellen durch 25-D1.16. Deshalb ist davon auszugehen, dass hier eine submaximale

Proliferation stattfindet. Dies steht im Einklang mit dem Ergebnis der zuvor gezeigten Messung der CD69-Expression. Die festgelegte Peptid-Menge scheint also auch bei den Proliferationsassays eine geeignete Konzentration für die Stimulation der OT-I Zellen zu sein.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es bei einer SIINFEKL-Konzentration von 2,5 ng/ml in Gegenwart des Antikörpers 25-D1.16 zu einem hochsignifikanten Abfall der OT-I Zellproliferation bis auf weniger als 25% der Maximalantwort kommt. Als Maximalantwort wurde der gemessene Wert ohne Antikörper-Zugabe ($c(25-D1.16) = 0 \text{ ng/ml}$) herangezogen, bei dem sich die OT-I Zellen ungehemmt teilen.

Bei Zugabe der Isotyp-Kontrolle zeigte sich konzentrationsunabhängig kein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation. Die inhibitorische Wirkung von 25-D1.16 scheint demnach auf dessen Bindungsspezifität für an MHC-I-Proteine gebundenes SIINFEKL zurückzuführen zu sein.

Überraschenderweise übte 25-D1.16 in diesem System seine maximal inhibierende Wirkung nicht bei der höchsten, sondern bei mittlerer Konzentration aus. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der im Überschuss vorhandene IgG-Antikörper nur mit einem seiner zwei Fab-Arme an das Epitop binden kann und somit die Avidität (Bindungsenergie einer multivalenten Bindung zwischen Antigen und Antikörper) und damit die blockierende Wirkung von 25-D1.16 gegenüber dem T-Zell Rezeptor sinkt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre eine unspezifische Aktivierung der Zellen durch intrazelluläre Signalwege bei Bindung eines Antikörpers an die MHC-I-Moleküle der Zellmembran (Geppert et al., 1989; Ruhwald et al., 1999; Turco et al., 1988) (siehe Kapitel 5.1).

4.3.3 Zytokinausschüttung durch OT-I Zellen in Gegenwart von SIINFEKL und 25-D1.16

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse aus 4.3.2 wurde die Interferon- γ -Ausschüttung der OT-I Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 2,5 ng/ml SIINFEKL und Verdünnungsreihen des Antikörpers 25-D1.16 und der Negativkontrolle PPV06 mittels ELISA quantifiziert.

IFN- γ wird von aktivierten CD8⁺ T-Zellen freigesetzt. Es vermittelt die Hochregulation der Moleküle, die für die Prozessierung und Präsentation intravesikulärer Antigene zuständig sind, einschließlich der MHC-I- und MHC-II-Moleküle selbst. Außerdem ist IFN- γ ein starker Makrophagen-Aktivator.

Für den Zytokin-ELISA wurde Überstand aus den Zellkultur-Näpfen entnommen und auf den Gehalt von IFN- γ untersucht.

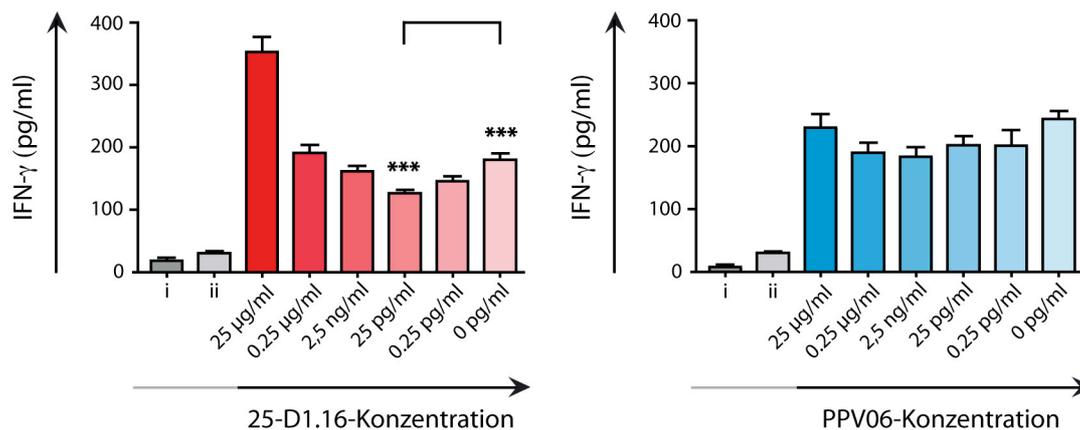


Abb. 4.8 Interferon- γ -Produktion durch OT-I Zellen in Gegenwart von SIINFEKL und 25-D1.16. 5×10^4 OT-I Zellen/ml wurden mit 2,5 ng/ml SIINFEKL und absteigenden Konzentrationen von 25-D1.16 bzw. PPV06 24 Stunden lang in Kultur gehalten. Anschließend wurde der Überstand aus den Näpfen entnommen und mittels Sandwich-ELISA auf seinen Gehalt an IFN- γ untersucht.

x-Achse: 25-D1.16-, bzw. IgG₁-Isotyp-Standard-Konzentrationen; y-Achse: Zytokin-Gehalt in pg/ml. Kontrollen ohne stimulierendes Peptid: i = OT-I Zellen, ohne 25-D1.16/PPV06; ii = OT-I Zellen und 25-D1.16/PPV06 (c = 25 μ g/ml).

Bei einer 25-D1.16-Konzentration von 25 pg/ml produzieren die OT-I Zellen 30% weniger IFN- γ als ohne Antikörperzugabe. Der höchste Zytokin-Gehalt befand im Überstand der OT-I Zellen, denen 25-D1.16 in einer Konzentration von 25 μ g/ml zugesetzt war. Die PPV06-Konzentration beeinflusst die Interferon-Produktion der OT-I Zellen nicht.

*** = $p < 0,001$.

Auch im Hinblick auf die Interferon- γ -Produktion zeigte sich eine hochsignifikante Suppression durch 25 pg/ml 25-D1.16.

In der Negativkontrolle war die INF- γ -Ausschüttung von unterschiedlichen PPV06-Konzentrationen unbeeinflusst.

Auch in diesem Assay wurde unerwartet eine Erhöhung der T-Zellaktivierung bei hohen 25-D1.16 Konzentrationen gemessen. Mögliche Erklärungen wurden in Kapitel 4.3.2 erwähnt.

4.4 Erkennung des Octapeptid-MHC-I-Komplexes durch 25-D1.16 auf Ovalbumin-synthetisierenden Zellen

In dem für die beschriebenen Aktivierungstests verwendeten in vitro-Modell sind die OT-I Zellen nicht nur Responder-Zellen, sondern sie fungieren gleichzeitig als Antigen-präsentierende Zellen, indem sie sich das Peptid SIINFEKL gegenseitig darbieten.

Im Modell der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) jedoch wird das Peptid als Neoautoantigen von Oligodendrozyten als Fragment eines in der Zelle selbst synthetisierten Proteins präsentiert.

Um den in vitro Versuchsaufbau der in vivo Situation der EAE besser anzunähern, wurde ein zweites Modell herangezogen. Statt EL4 oder OT-I Zellen von außen mit dem Peptid zu beladen, wurde eine Zelllinie gewählt, die das Peptid endogen produziert und mit Hilfe von MHC-I-Proteinen präsentiert. EG.7-OVA ist ein transfizierter Klon der EL4 Zelllinie, der Ovalbumin exprimiert (Moore et al., 1988). Eventuell verfälschende Effekte durch künstliche Beladung der OT-I Zellen mit SIINFEKL können so umgangen und eine realistischere Nachahmung der Gegebenheiten im Tiermodell erreicht werden.

Durch FACS-Analyse wurde zunächst nachgewiesen, dass 25-D1.16 den SIINFEKL-MHC-I-Komplex auch auf der Oberfläche dieser Zellen erkennt. Dies ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

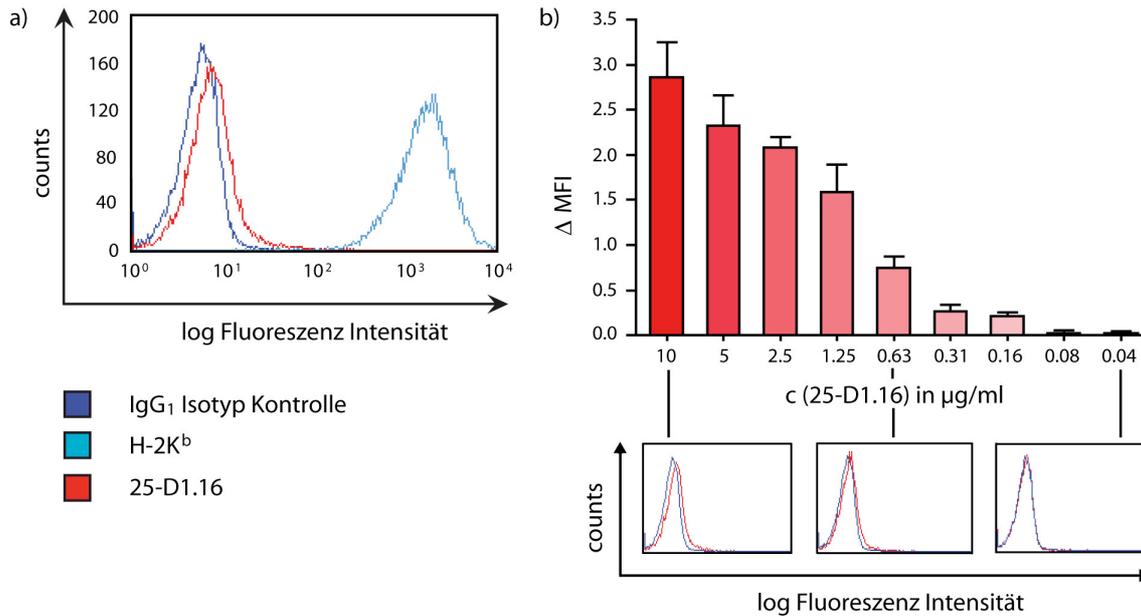


Abb. 4.9.a Oberflächenfärbung von EG.7-OVA Zellen. 25-D1.16 erkennt die in geringer Anzahl auf der Zelloberfläche von EG.7-OVA vorhandenen Peptid-MHC-I-Komplexe.

Farbkodierung: Maus-IgG₁-Isotyp-Standard (dunkelblau), H-2K^b (hellblau), 25-D1.16 (rot). PE-konjugierter Sekundärantikörper.

Abb. 4.9.b Titration des Antikörpers 25-D1.16 in einer FACS-Färbung. x-Achse: 25-D1.16-Konzentration in µg/ml. y-Achse: Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity).

EG.7-OVA Zellen wurden mit 1 µg/ml SIINFEKL für 1,5 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 25-D1.16, bzw. mit der IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle oder einem anti-H-2K^b-Antikörper und einem PE-konjugierten Sekundärantikörper. Unter dem Diagramm sind beispielhaft Original-FACS-Daten der jeweiligen 25-D1.16-Konzentration zu sehen (rot: 25-D1.16, blau: IgG₁-Maus-Isotyp-Kontrolle).

Je geringer die Konzentration von 25-D1.16, desto geringer ist die Anzahl der mit Antikörper markierten SIINFEKL:MHC-I-Komplexe.

Abbildung 4.9.a zeigt eine Oberflächenfärbung von EG.7-OVA Zellen mit einem Maus-IgG₁-Isotyp-Standard als Negativkontrolle (dunkelblaue Linie), anti-H-2K^b als Positivkontrolle (hellblau) und dem Antikörper 25-D1.16 (rot). Die leichte Rechtsverschiebung der Kurve des Antikörpers deutet darauf hin, dass 25-D1.16 den SIINFEKL:MHC-I-Komplex detektiert, obwohl dieser nur in kleiner Menge von ca. 90 Komplexen (Malarkannan et al., 1995; Rotzschke et al., 1991) auf der Oberfläche von EG.7-OVA Zellen vorhanden ist. Das in der Zelle synthetisierte SIINFEKL-Peptid muss mit Tausenden anderer ebenfalls endogen produzierter Peptide um die Bindungstasche von H-2K^b konkurrieren und liegt demnach nicht, wie bei exogener Beladung, im Überschuss vor. Diese Situation entspricht weitgehend den Gegebenheiten im Mausmodell der CD8 T-Zell vermittelten EAE. Dort wird das Peptid SIINFEKL ebenfalls nur in geringer Anzahl von Oligodendrozyten (Na et al., 2008) präsentiert.

Für Abbildung 4.9.b wurde eine Verdünnungsreihe des Antikörpers 25-D1.16 angelegt, mit der EG.7-OVA Zellen gefärbt wurden. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein Maus-IgG₁-Isotyp-Standard verwendet. Als Sekundärantikörper diente erneut ein PE-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper. Die roten Kurven stellen jeweils 25-D1.16, die blauen die Negativkontrolle dar. Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity) wurde aus der Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität der mit 25-D1.16 markierten EG.7-OVA Zellen und der Isotyp-Kontrolle errechnet.

Die Menge der durch 25-D1.16 markierten SIINFEKL:MHC-I-Komplexe nimmt mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers ab.

4.5 Interferenz von 25-D1.16 mit der Aktivierung von OT-I Zellen durch von EG.7-OVA Zellen endogen produziertes und präsentierte SIINFEKL

4.5.1 Einfluss des Antikörpers 25-D1.16 auf die CD69-Expression von SIINFEKL-stimulierten OT-I Zellen

Nun wurde der Effekt des Antikörpers 25-D1.16 auf die Aktivierung der OT-I Zellen in dem neuen EG.7-OVA-in vitro-Modell geprüft.

Hierzu wurde zunächst die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 ('early activation marker', siehe Kapitel 4.3.1) untersucht.

Abbildung 4.10 stellt die Ergebnisse einer FACS-Färbung auf CD69 von OT-I Zellen nach Inkubation mit EG.7-OVA Zellen und 25-D1.16 dar.

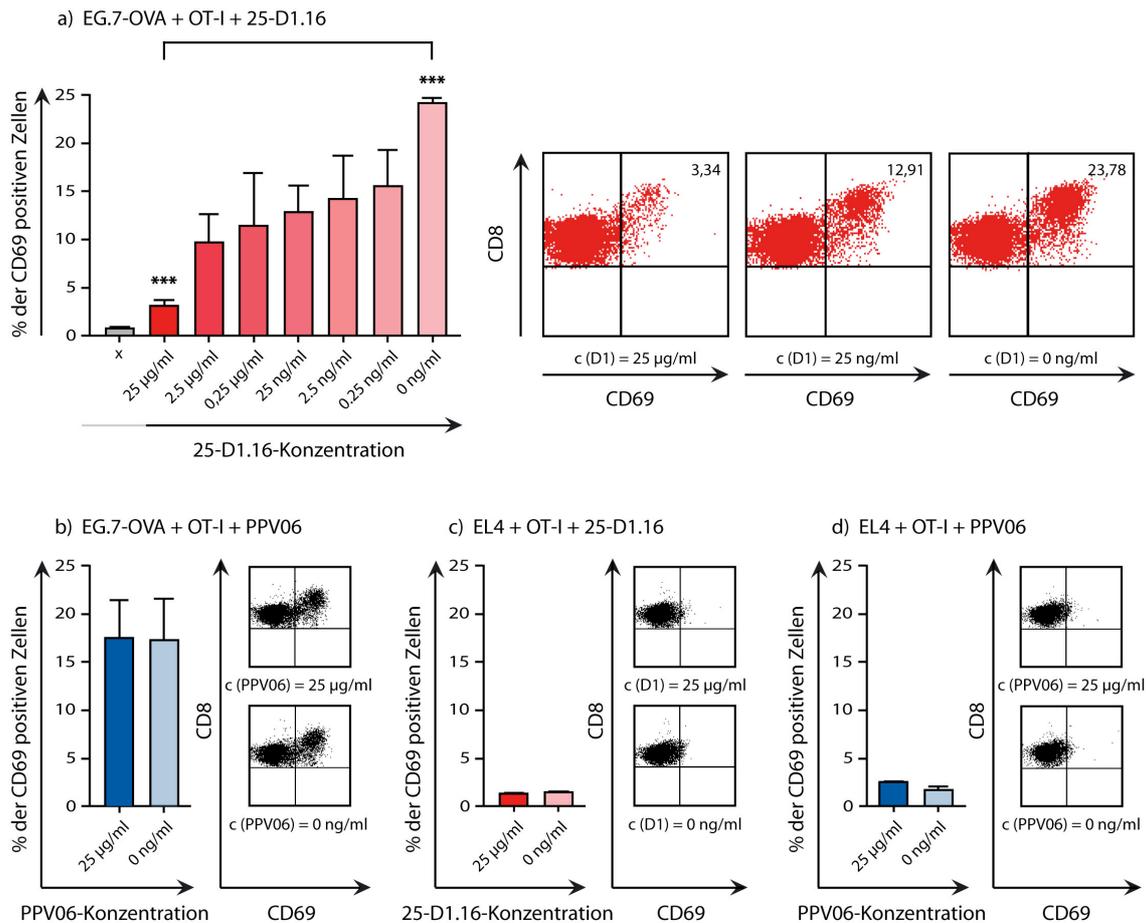


Abb. 4.10 25-D1.16 verhindert die Hochregulation von CD69 durch OT-I Zellen nach SIINFEKL-Stimulation. EG.7-OVA Zellen wurden mit OT-I Zellen in Gegenwart einer Verdünnungsreihe des Antikörpers 25-D1.16, bzw. des Kontroll-Antikörpers PPV06 24 Stunden lang co-kultiviert (a und b). Die FACS-Färbung erfolgte mit FITC anti-CD8 und anti-CD69. Identisch wurde mit einer co-Kultur von EL4 und OT-I Zellen verfahren (c und d). Balkendiagramme: x-Achse = 25-D1.16/PPV06-Antikörper-Konzentration, y-Achse: Anzahl der CD69 positiven Zellen in Prozent der Gesamt-Zellzahl. Neben den Diagrammen sind jeweils FACS-Daten der darunter angegebenen Antikörper-Konzentration mit durchschnittlicher Prozentzahl der CD69 positiven Zellen gezeigt. Die CD69-Expression wurde in der co-Kultur von EG.7-OVA und OT-I Zellen mit 25 µg/ml 25-D1.16 auf 14% des Expressionsniveaus der Probe ohne Antikörper reduziert. *** = $p < 0,001$. Farbkodierung: rot = EG.7-OVA / EL4 + OT-I + D1, blau = EG.7-OVA / EL4 + OT-I + PPV06.

OT-I Zellen wurden isoliert und mit EG.7-OVA Zellen co-kultiviert. Einer Hälfte der Proben wurde 25-D1.16 (Diagramm a) in verschiedenen Konzentrationen, der anderen der IgG₁-Maus-Isotyp-Standard PPV06 (b) zugegeben. Nach einem Tag wurde jeweils mit FITC anti-CD69 gefärbt, um den Anteil an CD69 positiven Zellen zu ermitteln.

Diagramm a) obiger Abbildung zeigt, dass 25-D1.16 die Hochregulation des Aktivierungsmarkers durch die stimulierten OT-I Zellen verhindert. Der Anteil an CD69-positiven Zellen wurde durch 25 µg/ml 25-D1.16 im Vergleich zu den Proben ohne Antikörper um über 85% gesenkt.

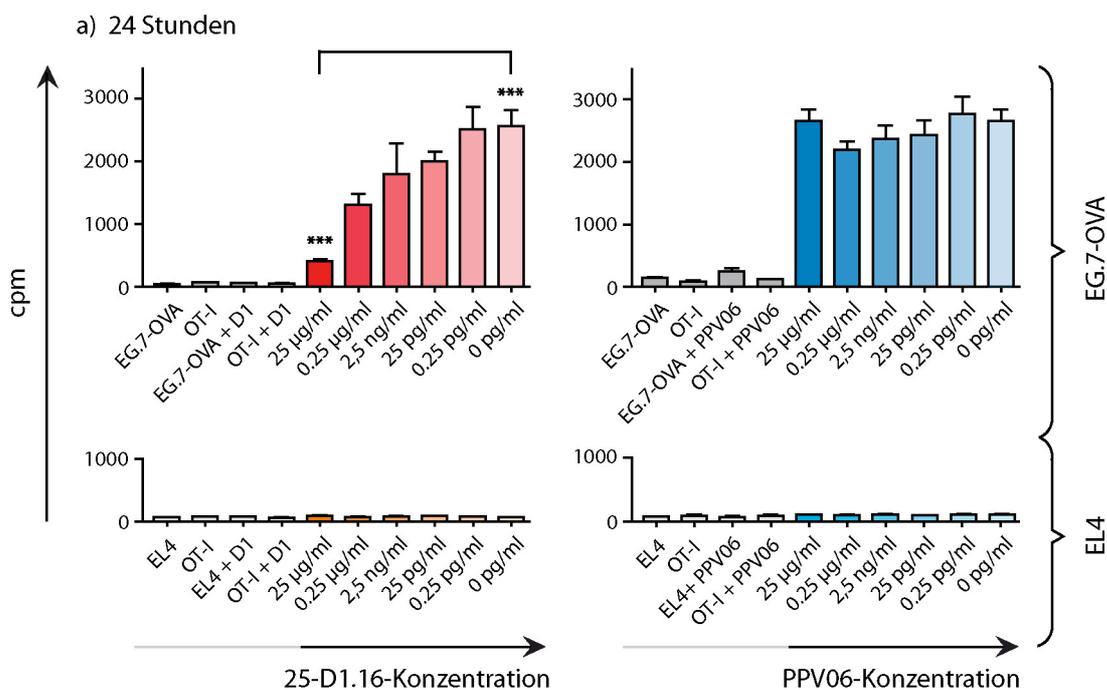
Eine biphasische Dosis-Wirkungskurve wie in den Aktivierungstests mit SIINFEKL beladener OT-I Zellen wurde nicht beobachtet.

Die Antikörper-Negativkontrolle PPV06 zeigte keinen Einfluss auf die CD69-Expression (Diagramm b).

Für die Histogramme c) und d) in der unteren Zeile wurden als zweite Zell-Negativkontrolle mit gleichem Protokoll OT-I Zellen und EL4 Zellen unter Zugabe von 25-D1.16 (c) bzw. PPV06 (d) kultiviert, gefärbt und analysiert. EL4 Zellen sind im Gegensatz zu den EG.7-OVA Zellen nicht Ovalbumin-transgen (siehe Kap. 2.7) und wurden abweichend von Kapitel 4.2 nicht mit SIINFEKL beladen. Demnach findet keine Aktivierung der OT-I Zellen und damit auch keine Hochregulation von CD69 statt. Weder 25-D1.16 noch PPV06 führen zu einer Veränderung der Expression.

4.5.2 Proliferation von OT-I Zellen in Gegenwart von 25-D1.16 bei Präsentation von SIINFEKL durch EG.7-OVA Zellen

Auch in diesem Setting sollte die Proliferation der OT-I Zellen zur Bestätigung der im vorhergehenden Kapitel gewonnenen Daten gemessen werden. Abbildung 4.11 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Proliferationsassays.



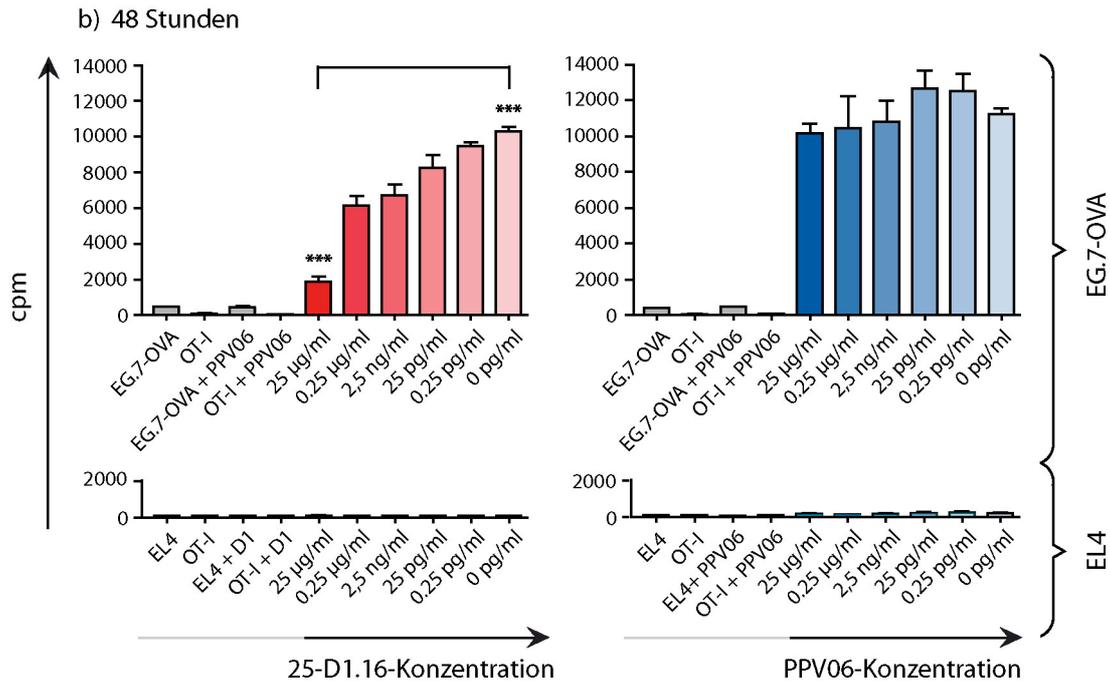


Abb. 4.11 Proliferation von OT-I Zellen in Anwesenheit von EG.7-OVA und 25-D1.16 im Zeitverlauf. EG.7-OVA Zellen dienten als Peptid-präsentierende Zellen. Sie wurden mit 50 Gy bestrahlt oder mit Mitomycin C behandelt, um die Zellteilung zu verhindern. CD8 T-Zellen wurden aus OT-I transgenen BL/6 Mäusen isoliert (siehe Kapitel 3.6). 1×10^4 EG.7-OVA Zellen/ml und 5×10^4 OT-I Zellen/ml wurden in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von 25-D1.16 (linke Spalte), bzw. PPV06 (rechte Spalte) kultiviert. Nach 24 Stunden (a), bzw. 48 Stunden (b) erfolgte die Zugabe von [3 H] Thymidin und nach jeweils 16 weiteren Stunden die Messung der Proliferation im β -Counter. Analog wurde mit EL4 Zellen verfahren (jeweils unterhalb der EG.7-OVA-Diagramme dargestellt). Die ersten vier Balken jedes Diagramms stellen verschiedene Kontrollen dar: nur EG.7-OVA bzw. EL4 Zellen; nur OT-I Zellen; EG.7-OVA bzw. EL4 und 25-D1.16/PPV06 (25 μ g/ml), OT-I und 25-D1.16/PPV06 (25 μ g/ml). Der Antikörper 25-D1.16 inhibiert die Proliferation der OT-I Zellen, denen das OVA-8-Peptid von EG.7-OVA Zellen dargeboten wird. Je höher die Konzentration des Antikörpers, desto effektiver die Hemmung der Proliferation. *** = $p < 0,001$. Farbkodierung: rot = 25-D1.16; blau = Negativkontrolle PPV06.

EG.7-OVA Zellen wurden mit 50 Gray bestrahlt oder mit Mitomycin C behandelt, um Mitosen zu verhindern. 6 Wochen alten OT-I transgenen Mäusen wurden Lymphknoten entnommen und daraus OT-I Zellen isoliert. Sie wurden mit EG.7-OVA Zellen einen Tag (Abb. 4.11.a), bzw. zwei Tage lang (Abb. 4.11.b) co-kultiviert, wobei einem Teil der Ansätze der Antikörper 25-D1.16 (linke Spalte), dem anderen Teil PPV06 (rechte Spalte) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde. Als Maximalwert wurde jeweils der Proliferationswert herangezogen, der ohne Zugabe des Antikörpers gemessen wurde.

Bei einer 25-D1.16-Konzentration von 25 μ g/ml wurde die Proliferation der OT-I Zellen, sowohl an Tag 1 als auch an Tag 2, hochsignifikant auf nur 16 % des Maximalwertes supprimiert. Die An- oder Abwesenheit der Antikörper-Negativkontrolle PPV06 veränderte die Proliferation nicht.

Als Zell-Negativkontrolle wurden erneut EL4 Zellen mit OT-I Zellen co-kultiviert und mit Verdünnungsreihen von 25-D1.16, bzw. von PPV06 versetzt. EL4 Zellen tragen keine mit SIINFEKL beladenen MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und stellen demnach keinen Aktivierungsstimulus für die OT-I Zellen dar. Es wurde folgerichtig keine nennenswerte Proliferation gemessen, eine Tatsache, die weder durch die Zugabe von 25-D1.16 noch von PPV06 beeinflusst wurde.

Abbildung 4.11 zeigt deutlich, dass 25-D1.16 die Proliferation von OT-I Zellen, denen das Peptid SIINFEKL von EG.7-OVA Zellen präsentiert wird, inhibiert.

Mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers werden weniger Bindungsstellen für den OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptor auf den EG.7-OVA Zellen durch 25-D1.16 blockiert. Dadurch nimmt die inhibitorische Wirkung des Antikörpers ab, weswegen sich die gemessenen Proliferationswerte langsam dem Maximalwert annähern.

4.5.3 IFN- γ -Produktion von OT-I Zellen in Gegenwart von 25-D1.16 bei Präsentation von SIINFEKL durch EG.7-OVA

Neben Expression von CD69 und Proliferationsrate ist die INF- γ -Ausschüttung ein weiterer Parameter für den Aktivierungszustand der OT-I Zellen.

Es wurde hierfür, wie schon in Kapitel 4.3.4 beschrieben, aus Kulturen von OT-I Zellen und EG.7-OVA Zellen mit zugesetztem Antikörper 25-D1.16 nach 24- bzw. 48- stündiger Inkubation Überstand entnommen. Anschließend wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt und der Gehalt an IFN- γ im Photometer bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 gezeigt.

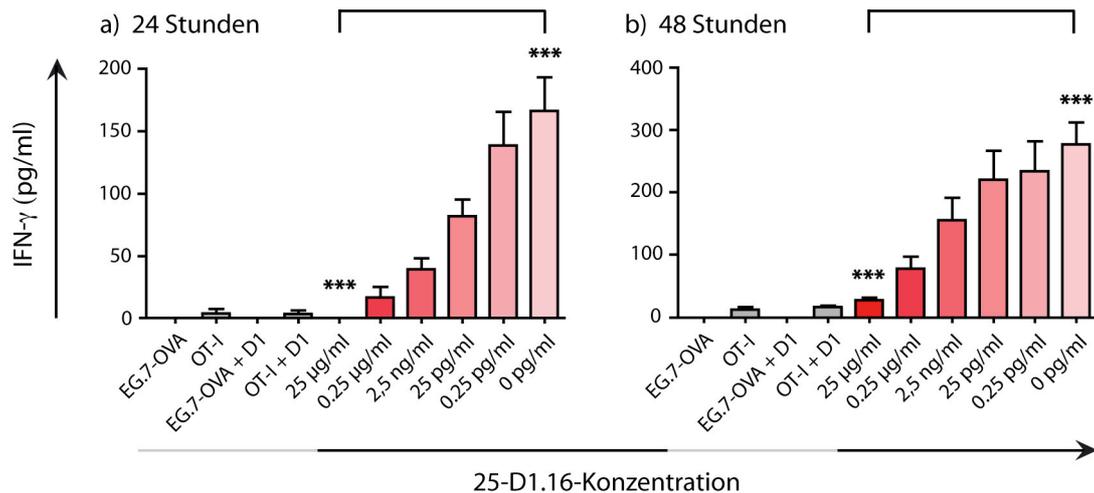


Abb. 4.12 Zytokinproduktion von OT-I Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von 25-D1.16 ermittelt per ELISA. Überstand der unter 4.5.1. beschriebenen Kulturen wurde nach 24 Stunden (a) und 48 Stunden (b) auf IFN- γ -Gehalt untersucht.

x-Achse: 25-D1.16-Konzentration; y-Achse: IFN- γ in pg/ml. Die ersten vier Balken jedes Diagramms beschreiben verschiedene Kontrollen: nur EG.7-OVA Zellen, nur OT-I Zellen, EG.7-OVA bzw. OT-I und 25-D1.16 (c = 25 μ g/ml).

Bei einer Antikörper-Konzentration von 25 μ g/ml wurde die IFN- γ -Produktion der OT-I Zellen auf nicht nachweisbare Werte (Tag 1), bzw. auf ein Zehntel des Wertes ohne Antikörper (Tag 2) reduziert. Mit fallender 25-D1.16-Konzentration nähert sich der Zytokin-Gehalt dem Maximalwert bei c (25-D1.16) = 0 pg/ml an.

*** = $p < 0,001$.

In Abb. 4.12.a ist die Zytokin-Konzentration nach 24 Stunden, in Abb. 4.12.b nach 48 Stunden dargestellt. An der x-Achse ist jeweils die zugegebene 25-D1.16-Konzentration, an der y-Achse die gemessene Konzentration von IFN- γ angegeben.

An Tag 1 wurde die Produktion des Zytokins in den Proben mit der höchsten Antikörper-Konzentration auf nicht nachweisbare Werte reduziert. Mit abnehmender Blockierung der Bindungsstellen auf den Peptid-präsentierenden Zellen werden die OT-I Zellen in zunehmendem Maß aktiviert und die Zytokinausschüttung steigt. Auch an Tag 2 wurde in den Proben mit der höchsten Antikörper-Konzentration ein hochsignifikant reduzierter IFN- γ -Gehalt nachgewiesen. Die IFN- γ -Produktion konnte zu diesem Zeitpunkt bis auf 10 % des uninhibierten Vergleichsniveaus supprimiert werden.

Die Blockade der Antigenerkennung durch 25-D1.16 vermag demnach nicht nur die Expression von CD69 (siehe Kapitel 4.5.1) und die Proliferation der OT-I transgenen T-Zellen (siehe Kapitel 4.5.2), sondern auch die IFN- γ -Sekretion effektiv zu reduzieren.

Durch die in-vitro Experimente dieser Arbeit war somit bewiesen, dass der Antikörper 25-D1.16 in ausreichend hoher Konzentration in einer Co-Kultur von EG.7-OVA Zellen und OT-I Zellen die Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten durch den Komplex SIINFEKL/H2K^b inhibiert. In diesem EAE-nahen Zellsetting zeigte sich eine deutliche Reduktion aller drei Aktivierungsparameter (CD69-Expression, Proliferation, Zytokin-Sekretion). Besonders die effiziente Suppression der IFN- γ -Sekretion ist im Hinblick auf die Testung von 25-D1.16 im Tiermodell vielversprechend. Die CD8 T-Zell vermittelte EAE ist in weiten Teilen abhängig von der IFN- γ -Produktion durch die OT-I Zellen, da dieses Zytokin zu einer Hochregulation der MHC-I-Proteine auf Oligodendrozyten führt. In vitro verstärkt IFN- γ die Erkennung des von Oligodendrozyten präsentierten OVA-8-Peptids (Na et al., 2008).

IFN- γ ist im Plasma ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Mäuse nachweisbar, bevor die Tiere Symptome einer EAE entwickeln (Na et al., 2008). Die Produktion dieses Zytokins durch die OT-I Zellen steht also am Anfang der Entzündungskaskade. Durch ihre Blockade ließe sich möglicherweise die zerstörerische Entzündungsreaktion in vivo schon bei Beginn unterdrücken.

4.6 Therapeutischer Nutzen des Antikörpers 25-D1.16 im ODC-OVA/OT-I Tiermodell in vivo

Um die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Ergebnisse im Tiermodell zu bestätigen und somit zu ergründen, ob der Antikörper 25-D1.16 in vivo ebenfalls die T-Zell Aktivierung durch Interferenz mit der Antigenerkennung verhindern kann und daher als Ansatzpunkt neuer Therapiestrategien zur Behandlung der Multiplen Sklerose dienen könnte, wurden Versuche mit ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen (siehe Kapitel 1.2.3 und 1.2.4) durchgeführt.

4.6.1 Evaluierung der klinischen Ausprägung der EAE

Während ODC-OVA beziehungsweise OT-I einzeln transgene Mäuse weder klinisch noch histopathologisch Anzeichen einer Erkrankung aufweisen,

entwickeln ODC-OVA/OT-I doppelt transgene Mäuse ungefähr ab dem zehnten Lebensstag das Bild einer fulminanten EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis).

Um doppelt transgene Nachkommen zu erhalten, wurden OT-I transgene und ODC-OVA transgene Mäuse gekreuzt. Am siebten Lebensstag wurden den Jungtieren unterschiedlich hohe Dosen des Antikörpers 25-D1.16 injiziert. Da zu diesem Zeitpunkt keines der Jungtiere Symptome einer EAE zeigte und somit einzeln und doppelt transgene Tiere nicht voneinander zu unterscheiden waren, wurde der Antikörper jeweils kompletten Würfen potenziell ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Mäuse verabreicht.

Die klinische Ausprägung der beobachteten Erkrankung nach 25-D1.16-Gabe wurde auf einer Scala von 1 bis 5 quantifiziert. Da die CD8 T-Zell-vermittelte EAE mit einer aufsteigenden Paralyse (Na et al., 2008) einhergeht, wurde das Krankheitsstadium anhand der Symptome wie folgt bewertet:

1. Paralyse des Schwanzes
2. Paralyse eines Hinterlaufes
3. Paralyse beider Hinterläufe
4. Paralyse aller vier Extremitäten, Tremor, tonisch-klonische Krämpfe
5. Exitus

Im Krankheitsstadium 4 ohne Besserungstendenz oder bei Versuchsende wurden die Tiere mit CO₂ getötet. Es folgte die Entnahme von Thymus, Milz, Blut, Schwanz, Gehirn und Rückenmark.

4.6.2 Phäno- und Genotypisierung

Um doppelt transgene von einzeln transgenen Tieren zu unterscheiden, wurden die Mäuse phäno- und genotypisiert.

Thymus und Milz wurden per FACS-Analyse auf das Vorhandensein transgener T-Zellen überprüft. Hierfür erfolgte eine Oberflächenfärbung der Thymus- und Milzzellen mit anti-CD4, anti-CD8 sowie mit gegen die beiden Ketten des OT-I T-

Zell-Rezeptors gerichteten Antikörpern anti-V α 2 und anti-V β 5 (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 4.13 sind jeweils exemplarisch die FACS-Daten einzelner CD4/CD8-Färbungen, sowie CD8/V α 2-Färbungen für Thymus und Milz von ODC-OVA, OT-I und ODC-OVA/OT-I transgenen Mäusen dargestellt. Es zeigten sich charakteristische Zellverteilungsmuster. Der relative Anteil von CD8⁺, CD4⁺ und doppelt positiven Zellen ist in den Dot-Plots angegeben.

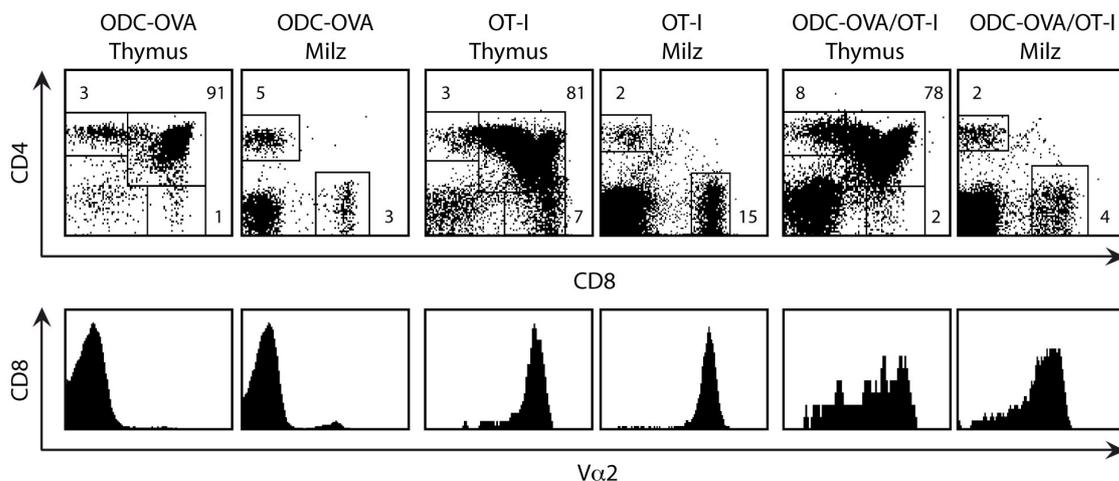


Abb. 4.13 Phänotypisierung der Mäuse mittels FACS-Färbung. Alle Mäuse, denen 25-D1.16 verabreicht wurde, wurden per FACS-Analyse auf das Vorhandensein OT-I transgener T-Zellen untersucht. Hierfür wurden Thymozyten und Milzzellen mit anti-CD8, anti-CD4, anti-V α 2 gefärbt. Trägt man CD8 und CD4 in Dot-Plots gegeneinander auf, ergeben sich die in der Abbildung sichtbaren Muster. Der relative Anteil von CD8⁺, CD4⁺ und doppelt positiven Zellen ist in den Dot-Plots angegeben. Die zu den einzelnen Dot-Plots gehörigen V α 2-Histogramme sind vertikal angeordnet.

Von links nach rechts: Jeweils Thymus und Milz einer ODC-OVA einzeln transgenen, einer OT-I einzeln transgenen und einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Maus.

Im Vergleich zu ODC-OVA Mäusen sind bei OT-I transgenen Tieren die CD8⁺ Zellen sowohl im Thymus, als auch in der Milz erhöht, während bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tieren eine Depletion dieser Zellen stattfindet. Ihre CD8-Zellzahl entspricht der von ODC-OVA einzeln transgenen Mäusen.

Vor allem in Bezug auf CD8⁺ T-Zellen besteht zwischen den Tieren ein deutlicher Unterschied. Während die CD8-Zellzahlen in Thymus und Milz von ODC-OVA transgenen Mäusen durchschnittlich 1 % bzw. 3 % betragen, waren sie bei OT-I transgenen Mäusen im Thymus auf 7 %, in der Milz auf 15 % erhöht. Grund hierfür ist die positive Selektion von OT-I Zellen durch H-2K^b/Selbst-Peptid Komplexe in OT-I transgenen Tieren (Hogquist et al., 1994). In ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen jedoch findet eine Depletion von reifen CD8⁺ T-Zellen statt (Na et al., 2008), weswegen die CD8-Zellzahlen in diesen Tieren im

Vergleich zu OT-I einzeln transgenen Tieren auf durchschnittlich 2 % im Thymus und 4 % in der Milz vermindert waren.

Aufgrund dieser Zellverteilungsmuster und mit Hilfe von OVA-PCRs (siehe unten) konnten ODC-OVA, OT-I und ODC-OVA/OT-I transgene Mäuse unterschieden werden.

Für den Nachweis des ODC-OVA-Transgens wurde Blut oder ein kleines Stück der Schwänze der Mäuse lysiert und zur Genotypisierung verwendet. Das Genmaterial wurde mittels PCR amplifiziert und auf die Expression des Neoautoantigens Ovalbumin getestet. Das PCR-Produkt einer OVA-PCR ist 733 bp lang (Cao et al., 2006). In Abbildung 4.14 ist das Ergebnis einer solchen OVA-PCR zu sehen.



Abb. 4.14 OVA-Genotypisierungs-PCR aus lysierten Schwänzen der mit 25-D1.16 behandelten Mäuse. Das OVA-PCR-Produkt ist ca. 750 bp lang. M = Marker-DNA-Leiter; + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle, 6 Proben von ODC-OVA-positiven Mäusen.

4.6.3 Histologie

Zur histologischen Bewertung der Entzündungsprozesse im Zentralnervensystem wurden den Mäusen Gehirn und Rückenmark entnommen, 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und mit unterschiedlichen Färbemethoden untersucht.

Die EAE ist charakterisiert durch extensive Zerstörung weißer Substanz in Folge von Entmarkungsreaktionen. Diese entstehen durch die Attacke OT-I transgener T-Zellen auf Ovalbumin-exprimierende Oligodendrozyten, die das OVA-Peptid SIINFEKL als antigenes Epitop über MHC-I-Moleküle präsentieren.

Besonders deutlich sichtbar sind diese Entmarkungsreaktionen in Kleinhirn, Hirnstamm, Nervus opticus und Rückenmark.

Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Histologie-Schnitte von Kleinhirn und Rückenmark einer OT-I einzeln transgenen und damit gesunden Maus sowie einer unbehandelten ODC-OVA/OT-I Maus, die Symptome der EAE im Stadium 4 entwickelt hatte.

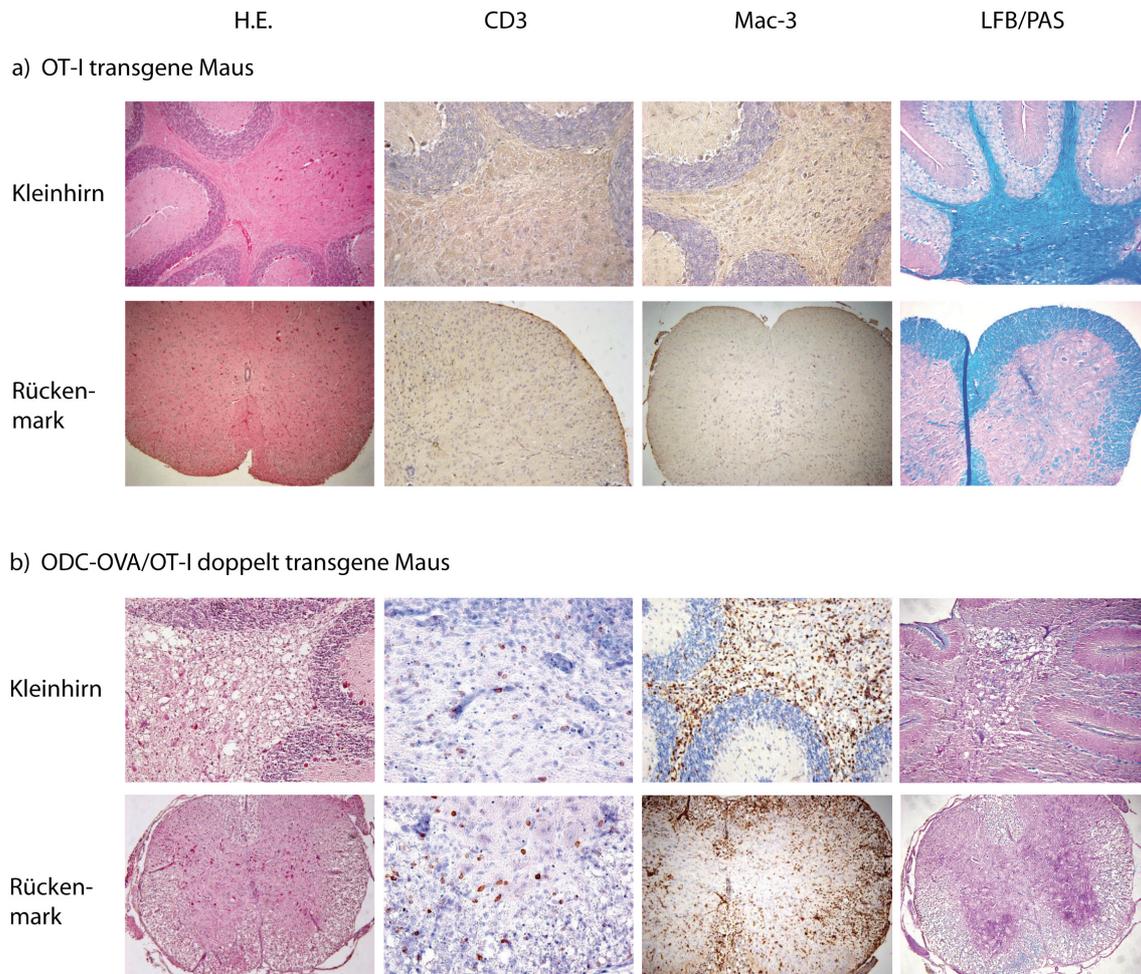


Abb. 4.15 Histopathologie einer OT-I transgenen und einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Maus, ohne Antikörper-Therapie. Repräsentative Schnitte des ZNS (Kleinhirn und Rückenmark) einer OT-I transgenen, gesunden Maus (a) und einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen, unbehandelten Maus im EAE-Stadium 4 (b). Die EAE ist gekennzeichnet durch spongiforme Zerstörung des Kleinhirns und der weißen Substanz des Rückenmarks. Von rechts nach links: H.E.-Färbung (Übersichtsfärbung, Vergleich der Gewebestruktur), CD3-Färbung (Nachweis von T-Lymphozyten), Mac-3-Färbung (Nachweis von Makrophagen) und Luxol Fast Blue (LFB)/PAS-Färbung (Visualisierung der Myelinscheiden, bzw. der Demyelinisierung). Die Aufnahmen für Abb. 4.15.b) wurden freundlicherweise von Frau Dr. S.-Y. Na zur Verfügung gestellt.

Die H.E.-Färbung dient der morphologischen Darstellung der Infiltrate und dem Vergleich der Entzündungsaktivität. Das Zentralnervensystem der an EAE erkrankten Mäuse zeigt massive perivaskuläre und parenchymale Infiltrate. Die

bei den gesunden Mäusen homogene Struktur der weißen Substanz des Rückenmarks und des Marklagers der Kleinhirnhemisphären ist aufgehoben.

Zur weiteren Differenzierung der infiltrierenden Zellen wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen den Oberflächenmarker CD3 von T-Lymphozyten durchgeführt. CD3-positive Zellen färben sich hierbei braun. Bei doppelt transgenen Tieren findet eine ausgeprägte Invasion immunreaktiver T-Zellen statt. In floriden Entmarkungsherden ist daher die Zahl CD3-positiver T-Zellen stark erhöht.

Außerdem wurde mittels Anti-Mac-3-Antikörpern die Einwanderung von Makrophagen visualisiert (braune gefärbte Zellen). Makrophagen sind die vorherrschenden Zellen in den Läsionen und in besonderem Maß für die Zerstörung der Markscheiden der Axone verantwortlich. In den Schnitten der an EAE erkrankten ODC-OVA/OT-I Maus sind zahlreiche perivaskulär liegende Makrophagen und Mikroglia sichtbar, während im gesunden Kontrolltier keine dieser braun gefärbten Zellen nachzuweisen sind. Eine erhöhte Anzahl an infiltrierenden Mac-3 positiven Makrophagen und Mikroglia ist typisches Zeichen einer EAE und lässt auf hohe Krankheitsaktivität schließen.

Die Färbung mit Luxol Fast Blue (LFB)/PAS stellt das Myelin blau dar und dient damit der Bestimmung des Ausmaßes an Demyelinisierung. In späten Krankheitsstadien kommt es zum vollständigen Myelinverlust unter weitgehendem Erhalt der Axone (Na et al., 2008). Das Zentralnervensystem der ODC-OVA/OT-I Mäuse zeigt massive Demyelinisierung im Bereich der gesamten weißen Substanz (siehe Abbildung 4.15). Wie bereits erwähnt, wird Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Schädigung der Myelinscheide zugesprochen. Dementsprechend korrelieren die Areale der Demyelinisierung und der vermehrten Makrophagen-Infiltration miteinander.

4.6.4 Therapie der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE mit dem monoklonalen Antikörper 25-D1.16

4.6.4.1 Krankheitsverlauf

Mehreren Würfen potentiell doppelt transgener Tiere wurden am siebten Lebenstag jeweils 100 µg, 200 µg oder 500 µg des gereinigten Antikörpers 25-D1.16 in einer PBS-Lösung einmalig intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurden die Mäuse jeden Tag beobachtet und ihr Krankheitsstadium bewertet.

In Abbildung 4.16 ist die klinische Evaluation der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäuse zu sehen, denen 25-D1.16 verabreicht wurde (a-c). An der x-Achse sind die Tage nach Antikörper-Gabe am siebten Lebenstag, an der y-Achse der mittlere EAE-Punktwert (siehe Kapitel 4.4.1) der behandelten Tiere aufgetragen. Die in Diagramm d) gezeigten Daten stammen von doppelt transgenen ODC-OVA/OT-I Mäusen ohne Antikörper-Therapie. Hier kennzeichnet die x-Achse die Tage nach Geburt. OT-I einzeln transgene Tiere, denen 25-D1.16 verabreicht wurde dienten als Negativkontrolle (e).

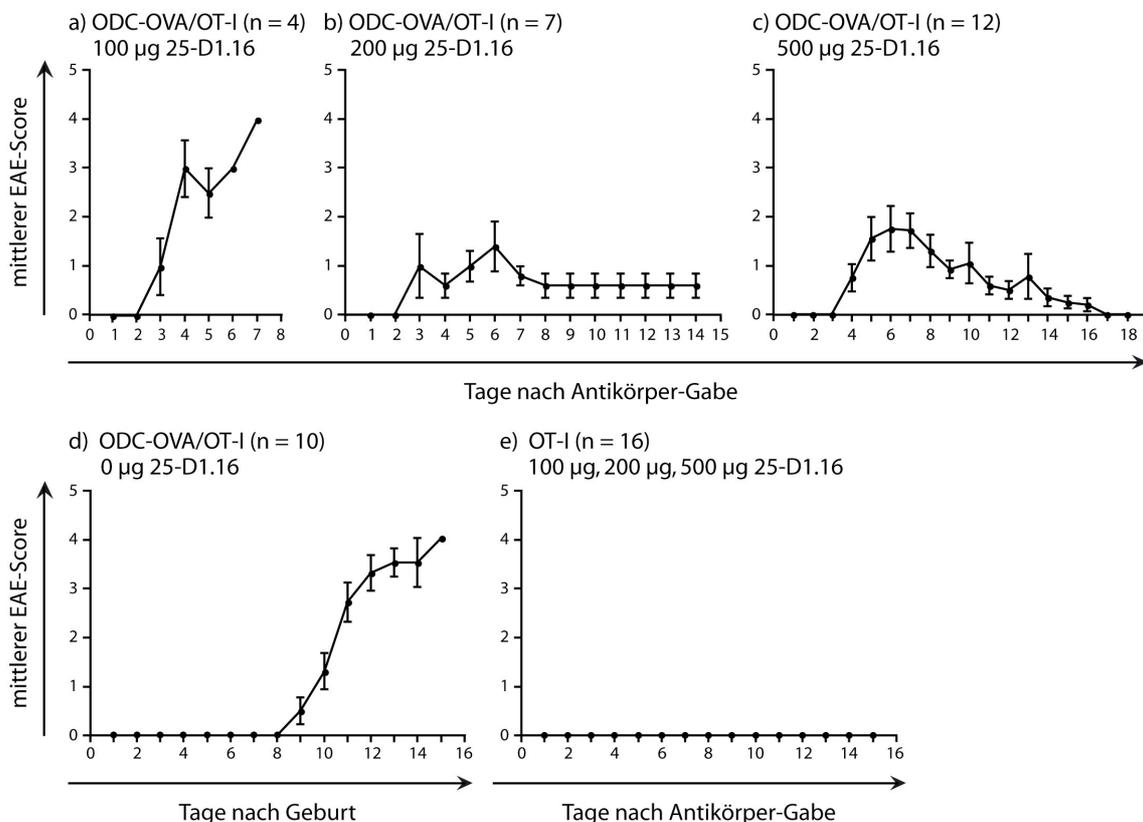


Abb. 4.16 EAE-Krankheitsverlauf bei ODC-OVA/OT-I Mäusen nach Behandlung mit 25-D1.16.

x-Achse: Anzahl der Tage nach Antikörper-Gabe (in PBS i.p. am siebten Lebenstag), bzw. Anzahl der Tage nach Geburt;
y-Achse: mittlerer EAE-Score.

Die verabreichte 25-D1.16-Dosis, sowie die Anzahl der behandelten Tiere sind über den Diagrammen angegeben.

a) Vier ODC-OVA/OT-I doppelt transgene Mäuse entwickelten trotz Injektion einer Antikörper-Dosis von 100 µg eine ausgeprägte EAE.

b) Die Applikation von 200 µg 25-D1.16 schützte 5/7 ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen vor einer letalen EAE. Dabei entwickelten 2/5 Tieren überhaupt keine Symptome, 3/5 erkrankten transient und erholten sich wieder. Bei zwei der ODC-OVA/OT-I Mäuse wurde eine fulminante EAE beobachtet.

c) 10/12 doppelt transgenen Tieren konnten durch die Therapie mit 500 µg 25-D1.16 vor einem letalen Verlauf der EAE geschützt werden. 7/10 entwickelten keine oder nur sehr milde Symptome, 3/10 zeigten transient ausgeprägte Symptomatik, regenerierten sich aber nach einigen Tagen wieder. 2/12 Mäusen erholten sich zwar nach initialer schwerer Erkrankung, starben jedoch nach der Erholung an ungeklärter Ursache.

d) Positivkontrolle: 10 ODC-OVA/OT-I Mäuse entwickelten ohne Antikörper-Therapie eine fulminante EAE.

e) Negativkontrolle: 16 OT-I transgene Tiere, denen der Antikörper in verschiedenen Dosierungen verabreicht wurde, zeigten keine Symptome und dienten als Kontrolle.

Wie in Diagramm a) zu erkennen, hatte der Antikörper in der Dosierung von 100 µg keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Alle vier doppelt transgenen Mäuse entwickelten trotz 25-D1.16-Gabe eine fulminante EAE, die rasch zum Krankheitsstadium 4 führte.

17 Tieren wurde eine Dosis von 200 µg 25-D1.16 verabreicht. Sieben der Tiere waren ODC-OVA/OT-I doppelt transgen (Diagramm b). Zwei (29%) der doppelt transgenen Mäuse erkrankten vier Tage nach Antikörper-Gabe an EAE und mussten entsprechend den Tierschutzrichtlinien getötet werden. Drei Tiere (42%) entwickelten unterschiedlich ausgeprägte Symptome, erholten sich jedoch nach einigen Tagen von der Erkrankung. Während sich ein Tier vollständig erholte und zum Zeitpunkt der Organentnahme klinisch keine Symptome mehr zeigte, war bei den anderen beiden Mäusen noch eine leichte Gangataxie zu sehen. Dies wurde als „Restsymptom“ mit einer 1 auf der EAE-Skala bewertet. Zwei doppelt transgene Mäuse (29%) entwickelten überhaupt keine Symptome einer EAE.

Bei Verabreichung von 200µg 25-D1.16 zeigte sich also ein deutlich abgemilderter Krankheitsverlauf mit positivem Einfluss auf die Überlebensrate.

Es sollte nun getestet werden, ob sich durch eine weitere Dosiserhöhung die Therapieeffektivität erhöhen und der Ausbruch der Erkrankung verhindern lässt. Insgesamt 15 Tieren wurden deshalb 500 µg 25-D1.16 verabreicht (siehe Abbildung 4.16.c). Die Mehrzahl der 12 doppelt transgenen, mit 25-D1.16 behandelten Mäuse entwickelte unterschiedlich ausgeprägte Symptome der

EAE. Bei über 80% bildete sich die Erkrankung jedoch wieder zurück. Sie zeigten zum Ende des Versuchs entweder keine oder nur eine leichte Restsymptomatik. Besonders die Tatsache, dass einige Tiere eine fast vollständige Remission erfuhren, obwohl sie bereits kurzzeitig das Stadium der Tetraplegie (Stadium 4) erreicht hatten, ist überzeugend.

Nur zwei von zwölf Tieren verstarben unerwartet nach erfolgreicher Therapie mit dem Antikörper. Beide hatten sich von einer ausgeprägten EAE (Stadium 4) erholt und zeigten nur noch geringe neurologische Defizite in Form einer leichten Gangataxie. Ihr Tod lässt sich am wahrscheinlichsten durch ihre Wachstumsretardierung und der damit einhergehenden mangelnden Durchsetzungsfähigkeit bei der Futteraufnahme erklären (siehe Kap. 5.2).

Als Positivkontrolle dienten 10 doppelt transgene Tiere, denen kein Antikörper verabreicht wurde. Sie zeigten allesamt schwerste Verläufe einer EAE und mussten in Krankheitsstadium 4 getötet werden.

16 OT-I einzeln transgenen Mäusen wurden 100 µg, 200 µg oder 500 µg 25-D1.16 verabreicht. Sie entwickelten keinerlei Symptome einer EAE.

In den Experimenten an ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen hatte der Antikörper 25-D1.16 in hohen Konzentrationen also durchschlagenden Effekt auf Krankheitsverlauf und Letalität.

4.6.4.2 Wachstumskurven von mit 500 µg 25-D1.16 behandelten doppelt transgenen Mäusen

Exemplarisch für alle mit 25-D1.16 behandelten Mäuse zeigt Abbildung 4.17 den Gewichtsverlauf von 9 Mäusen, die mit 500 µg des Antikörpers therapiert wurden. Sie wurden nach Antikörper-Applikation täglich gewogen. Das Körpergewicht ist in Prozent des Gewichtes am Tag 1 nach der Verabreichung von 25-D1.16 angegeben.

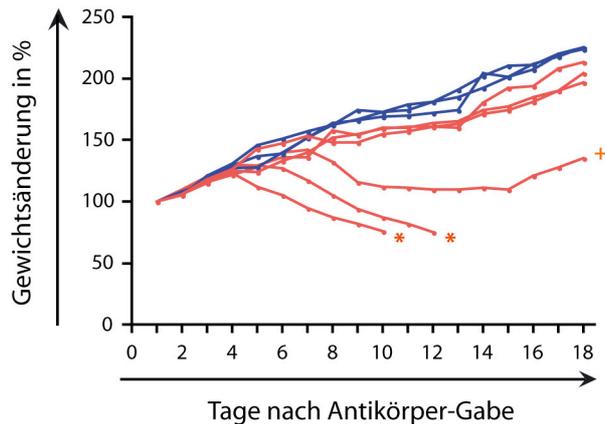


Abb. 4.17 Wachstumskurven der mit 500 µg 25-D1.16 behandelten doppelt transgenen Tiere. 9 Mäuse wurden nach Antikörper-Gabe täglich gewogen. Auf der x-Achse sind die Tage nach 25-D1.16-Behandlung aufgetragen. Die y-Achse kennzeichnet das Körpergewicht der Mäuse in Prozent des Gewichtes am Tag 1 nach Antikörper-Applikation. Die Kurven der OT-I transgenen Mäuse sind blau dargestellt. Da diese Tiere völlig gesund waren, entsprechen ihre Kurven normalen Wachstumskurven. In roter Farbe sind die Wachstumskurven der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tiere eingezeichnet, die unterschiedlich ausgeprägte EAE-Symptomatik zeigten. Milde Symptome beeinflussten das Wachstum nur wenig, während Tiere mit einem schweren Krankheitsverlauf deutlich an Gewicht verloren. Die mit + gekennzeichnete Kurve gehört zu einer doppelt transgenen Maus, die nach initialer schwerer EAE-Symptomatik (Stadium 4) eine vollständige Remission erfuhr; * kennzeichnet die Kurven von zwei Tieren, deren Krankheits-Ausprägung sich durch die Antikörper-Therapie von Stadium 4 hinzu Stadium 1 besserte, die jedoch im Verlauf ihr Wachstumsdefizit nicht mehr aufholen konnten und verstarben (siehe Kap. 4.6.4.1).

Die blauen Kurven gehören zu OT-I einzeln transgenen Mäusen, die keine EAE-Symptome zeigten. Sie nahmen nach der Geburt stetig zu. Ihre Wachstumskurven entsprechen denen von Wildtyp-Mäusen.

Die roten Kurven stellen die Gewichtskurven von ODC-OVA/OT-I Mäusen dar, die unterschiedlich ausgeprägte Krankheitssymptome entwickelten. Tiere mit einer durch den Antikörper abgemilderten Verlaufsform nahmen zwar langsamer zu als die Vergleichsgruppe, aber dennoch kontinuierlich. Aus den mit + und * gekennzeichneten Kurven, die jeweils Tiere mit schweren Verläufen repräsentieren, wird deutlich, dass eine schwere EAE mit einer massiven Wachstumsretardierung und Gewichtsreduktion einhergeht. Zwei dieser drei Tiere starben trotz initialer Erholung von einer Erkrankung im Stadium 4, wahrscheinlich an in Kapitel 4.6.4.1 und in der Diskussion (Kap. 5.2) beschriebenen Ursachen.

4.6.4.3 Histopathologie der mit 25-D1.16 behandelten ODC-OVA/OT-I Mäuse

Die folgenden Abbildungen zeigen stellvertretend für alle mit 25-D1.16 behandelten Mäuse Histologie-Schnitte von Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Die verabreichte Antikörper-Dosis (100 µg, 200 µg und 500 µg) ist über den Bildern angegeben.

100 µg 25-D1.16

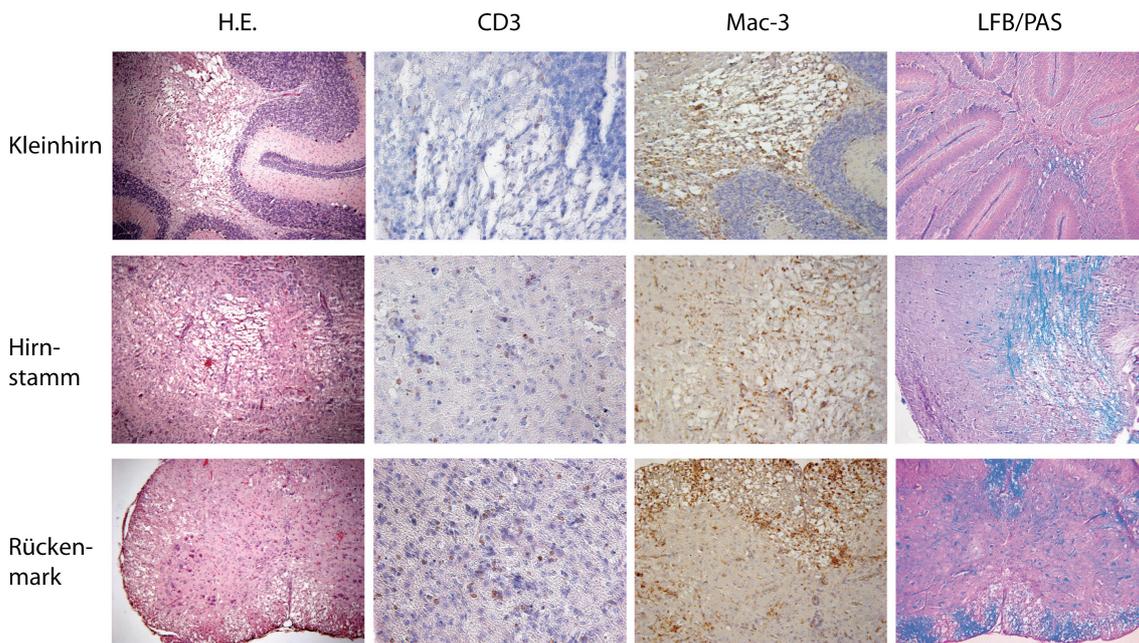


Abb. 4.18 EAE-Läsionen im ZNS einer mit 100 µg 25-D1.16 behandelten ODC-OVA/OT-I Maus. Die mit niedriger Antikörper-Dosis therapierten doppelt transgenen Mäuse entwickelten eine fulminante EAE. Die Bilder zeigen ausgeprägte lympho-monozytäre perivaskuläre und parenchymale Infiltrate. Einwandernde T-Zellen und Makrophagen färben sich in der CD3, bzw. Mac-3 Färbung braun. Ausgeprägte Markscheidendegeneration in der LFB/PAS-Färbung. Das Ausmaß der Zerstörung des Zentralnervensystems gleicht dem der unbehandelten doppelt transgenen Tiere (siehe Abb. 4.16.).

Von links nach rechts: H.E.-Färbung, CD3-Färbung, Mac-3-Färbung, Luxol-Fast-Blue-Färbung; von oben nach unten: Gewebeschnitte aus Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark.

Abb. 4.18 zeigt repräsentative Schnitte des Zentralnervensystems einer ODC-OVA/OT-I Maus, der 100 µg 25-D1.16 injiziert wurden. Trotz Antikörper-Gabe wiesen diese Tiere eine heftige Entzündungsreaktion, T-Zellen- und Makrophagen/Mikroglia-Infiltration, sowie ausgeprägte Demyelinisierung auf. Der Therapieversuch der ODC-OVA/OT-I Mäuse mit 100 µg 25-D1.16 bewirkte demnach keine histologisch sichtbare Reduktion der Erkrankung im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (siehe Kapitel 4.1.3).

In Abbildung 4.19 sind beispielhaft Schnitte eines ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tieres dargestellt, das mit 200 µg 25-D1.16 behandelt wurde. Wie die meisten der mit dieser Antikörper-Dosis behandelten Mäuse, erfuhr dieses Tier nach initialer Symptomatik eine fast vollständige Remission (siehe Kapitel 4.1.4.1).

200 µg 25-D1.16

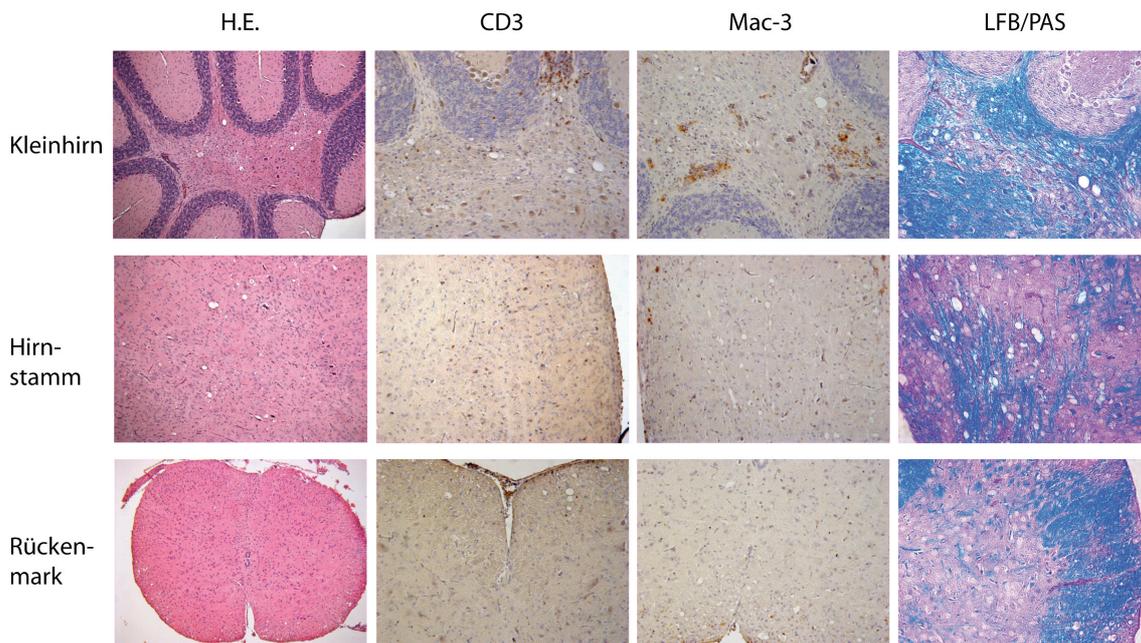


Abb. 4.19 Histopathologie einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Maus, der 200 µg 25-D1.16 injiziert wurden. Die Mehrzahl der mit 200 µg Antikörper behandelten Tiere erkrankte nur vorübergehend und wies zum Zeitpunkt der Organentnahme geringgradige Restsymptomatik auf. Die Gewebeschnitte zeigen in der H.E.-Färbung eine im Vergleich zu Schnitten von untherapierten Mäusen deutlich reduzierte Entzündungsreaktion mit weitgehend intakter Gewebsarchitektur. In CD3- und Mac-3-Färbung sind nur moderate, v.a. perivaskulär angeordnete Infiltrate von CD3 T-Zellen und Makrophagen (braun gefärbte Zellen) nachweisbar. Die LFB/PAS-Färbung macht die therapie-bedingte Remyelinisierung der Axone sichtbar. Von links nach rechts: H.E.-Färbung, CD3-Färbung, Mac-3-Färbung, Luxol-Fast-Blue-Färbung; von oben nach unten: Gewebeschnitte aus Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark.

In der H.E.-Färbung sind lediglich geringgradige Vakuolisierung und wenig ausgeprägte Infiltrate zu sehen.

Vergleicht man die Menge der infiltrierenden Immunzellen miteinander, so finden sich in den Histologieschnitten der mit 200 µg 25-D1.16 immunisierten ODC-OVA/OT-I Mäuse deutlich weniger CD3 T-Zellen und Makrophagen, als in Gewebeschnitten un behandelter Mäuse (siehe Abbildung 4.16).

Die LFB/PAS-Färbung zeigt den Grad der Myelinisierung im ZNS. Die Tiere

hatten sich zum Zeitpunkt der Organentnahme klinisch wieder weitgehend erholt (siehe Kapitel 4.1.4.1). Histologisch zeigten sich nun selbst bei Tieren, die vorübergehend an schweren EAE-Symptomen litten zum Zeitpunkt der Organentnahme wesentlich weniger demyelinisierte Areale als bei Tieren im Krankheits-Stadium 4. Offensichtlich findet also im Lauf der Remission eine schrittweise Remyelinisierung der Axone statt. Die histopathologisch sichtbaren Residuen der Erkrankung nach erfolgreicher Therapie stimmen mit der bei den Tieren beobachteten leichten Gangataxie überein.

Noch überzeugender war der therapeutische Erfolg bei einer Antikörper-Dosis von 500 µg. Hier konnten über 80% der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tiere vor einem letalen Ausgang der EAE geschützt werden. Sie wiesen bei Versuchsende histologisch größtenteils ein gesundes Zentralnervensystem oder im Falle einer milden Restsymptomatik allenfalls leichte histologische Krankheitsresiduen auf. Schnitte aus dem Zentralnervensystem einer solchen, mit 500 µg 25-D1.16 erfolgreich therapierten doppelt transgenen Maus zeigt Abb. 4.20.

Zu sehen ist ein Zentralnervensystem mit intakter Gewebsarchitektur ohne Zeichen einer Entzündungsreaktion. Weder in Kleinhirn, noch in Hirnstamm oder Rückenmark sind infiltrierende T-Zellen oder Makrophagen/Mikroglia sichtbar. Die LFB/PAS-Färbung zeigt durchgängig myelinisierte Axone ohne Entmarkungsherde.

500 µg 25-D1.16

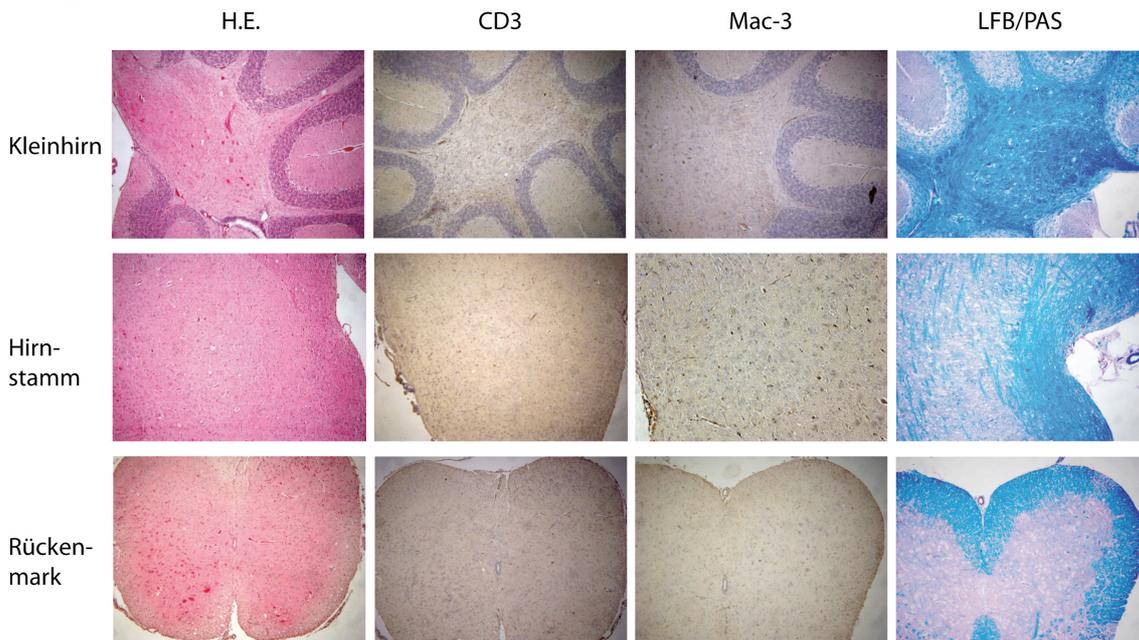


Abb. 4.20 Repräsentative Schnitte aus dem ZNS einer mit 500 µg 25-D1.16 immunisierten ODC-OVA/OT-I Maus. Die erfolgreich therapierten Tiere weisen ein gesundes Zentralnervensystem ohne EAE-Läsionen auf. Es bestehen keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion, die Gewebsarchitektur ist vollständig intakt. In den immunohistochemischen Färbungen sind weder in Kleinhirn, noch in Hirnstamm, noch in Rückenmark infiltrierende CD3-positive T-Zellen oder Makrophagen/Mikroglia sichtbar. Die LFB/PAS-Färbung zeigt keinerlei Entmarkungsherde, sondern durchgängig myelinisierte Axone.

Von links nach rechts: H.E.-Färbung, CD3-Färbung, Mac-3-Färbung, Luxol-Fast-Blue-Färbung; von oben nach unten: Gewebeschnitte aus Kleinhirn, Hirnstamm und Rückenmark.

4.6.4.4 Nachbeobachtung von erfolgreich therapierten doppelt transgenen Mäusen

Da der Antikörper 25-D1.16, ähnlich wie Antikörper bei einer passiven Impfung, dem natürlichen Abbau unterworfen ist und eine Halbwertszeit von nur drei Wochen hat, sollte untersucht werden, ob die Erkrankung nach einer gewissen Latenzzeit erneut auftritt. Deswegen wurde die Hälfte der behandelten doppelt transgenen Mäuse über drei Monate nachbeobachtet. Sie entwickelten sich während dieser Zeit regelrecht. Bei keinem der Tiere trat ein Rezidiv auf.

4.6.4.5 Effekt der Therapie mit 200 und 500 µg 25-D1.16 auf die Entwicklung OVA-spezifischer T-Zellen in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen

Thymozyten, die den OT-I T-Zell-Rezeptor exprimieren, werden durch H-2K^b/Selbst-Peptid-Komplexe „überselektiert“ (Hogquist et al., 1994), was bei OT-I transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu einer Vermehrung von

CD8⁺ T-Zellen in Thymus und in der Peripherie führt.

ODC-OVA/OT-I doppelt transgene Mäuse besitzen zwar normale Gesamtzellzahlen im Thymus, aber reife CD4⁻CD8⁺ Thymozyten und periphere CD8⁺ T-Zellen sind stark erniedrigt. Ursache hierfür könnte die Expression von OVA im Thymus und/oder in anderen Organen sein. Allerdings konnte in keinem Organ außer in Gehirn und Rückenmark OVA-mRNA oder -Protein nachgewiesen werden. Auch findet bei Einkreuzen eines CD4-positiven OVA-spezifischen TCRs (OT-II) in ODC-OVA transgene Mäuse keine negative Selektion der OVA-reaktiven T-Zellen statt (Na et al., 2008).

Wahrscheinlicher ist daher die Freisetzung von OVA aus dem Zentralnervensystem in die Blutbahn, als Folge des Angriffs der OT-I Zellen auf die OVA-präsentierenden Oligodendrozyten, bevor die Blut-Hirn-Schranke gegen Ende der zweiten Lebenswoche für CD8⁺ T-Zellen impermeabel wird. Übereinstimmend mit dieser Hypothese setzt die negative Selektion der OVA-reaktiven CD8⁺ T-Zellen im Thymus erst nach dem Angriff der OT-I Zellen auf die Oligodendrozyten ein (Na et al., 2008).

In dieser Arbeit sollte nun in diesem Zusammenhang geprüft werden, ob eine erfolgreiche Therapie mit 200 µg oder 500 µg 25-D1.16 die Depletion der reifen CD8⁺ Zellen in ODC-OVA/OT-I Mäusen modulieren kann.

Beim Vergleich der CD8-Zellzahlen von unbehandelten ODC-OVA/OT-I Mäusen mit denen von therapierten Mäusen, war dies nicht der Fall. Wenngleich der durchschnittliche Anteil an reifen CD8⁺ T-Zellen bei therapierten ODC-OVA/OT-I Mäusen etwas höher war als bei unbehandelten doppelt transgenen Mäusen, ließ sich keine generelle Tendenz der „Erholung“ der CD8-Zellzahlen feststellen. Auch bei ODC-OVA und OT-I einzeln transgenen Tieren blieb das Verhältnis von CD4⁺-, CD8⁺- und doppelt positiven Zellen durch die Verabreichung von 25-D1.16 unbeeinflusst.

In Abbildung 4.21 sind FACS-Färbungen der Thymocyten und Milzzellen einzelner unbehandelter ODC-OVA, OT-I, ODC-OVA/OT-I Mäuse und von ODC-OVA, OT-I und ODC-OVA/OT-I Mäusen, denen 500 µg 25-D1.16 verabreicht wurde, abgebildet. Der relative Anteil an CD4⁺, CD8⁺ und doppelt positiven Zellen ist in den Dot-Plots angegeben.

In Klammern stehen die Durchschnittswerte für alle untersuchten Tiere.

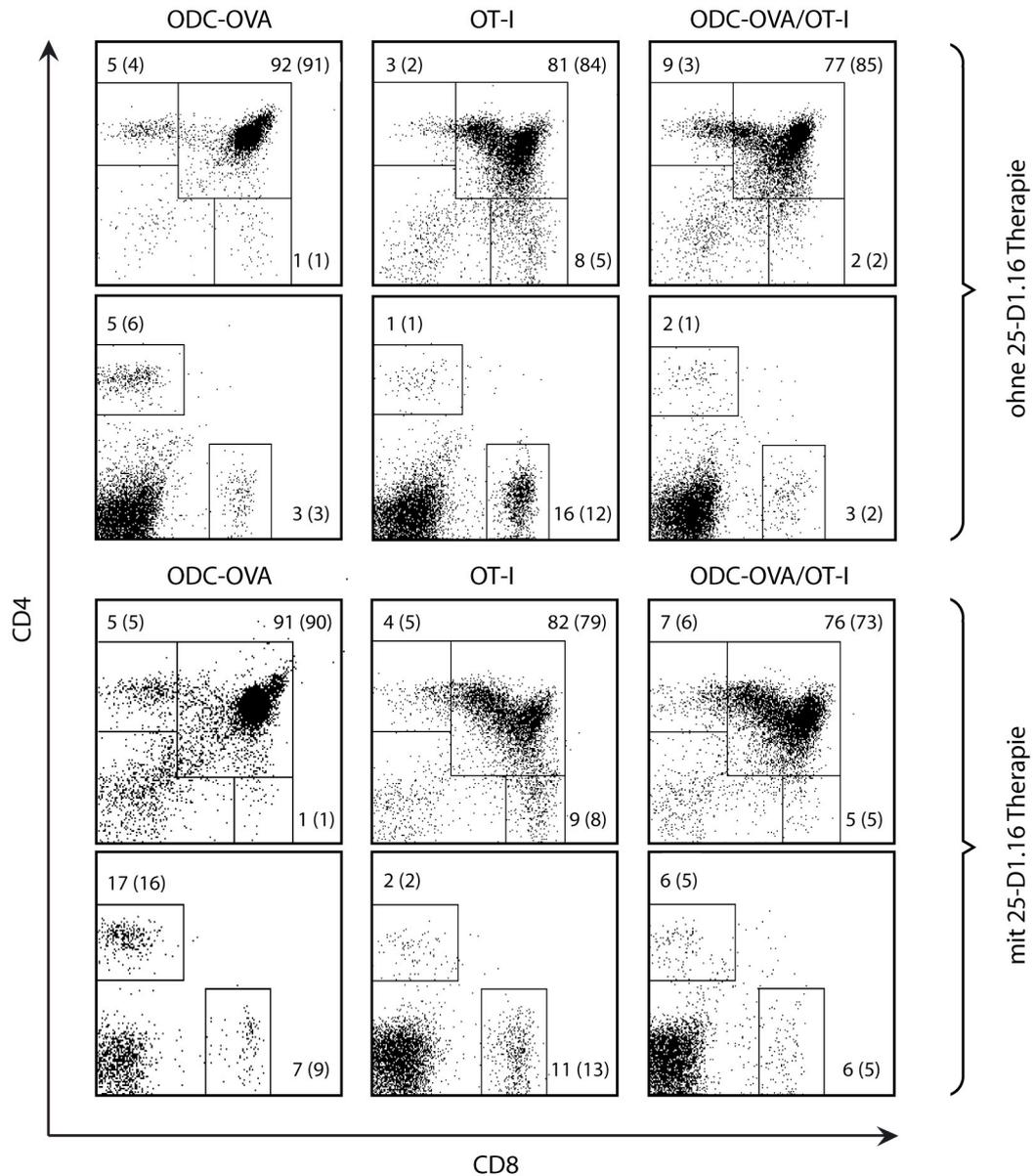


Abb. 4.21 Vergleich der CD8 Zellzahlen von mit 200 und 500 μg 25-D1.16 behandelten und unbehandelten Tieren. Entnahme von Thymi und Milzen aus ODC-OVA, OT-I und ODC-OVA/OT-I Mäusen, denen 200 bzw. 500 μg 25-D1.16 verabreicht wurde. Die anschließende Färbung mit anti-CD4 und anti-CD8 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zahlen der CD8⁺ T-Zellen in unbehandelten und behandelten Mäusen. Die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper hatte also weder Einfluss auf die Zellzahlen in Thymus und Milz von ODC-OVA oder OT-I Mäusen, noch auf die der doppelt transgenen Tiere. Die Daten der unbehandelten Tiere wurden von Frau Dr. S.-Y. Na zur Verfügung gestellt.

Die Analyse der CD4 und CD8 Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zahlen der CD8⁺ T-Zellen in unbehandelten und behandelten Mäusen.

Die Therapie mit 200 μg oder 500 μg hatte somit weder Einfluss auf die Zellzahlen in Thymus und Milz von ODC-OVA und OT-I Mäusen, noch auf die der doppelt transgenen Tiere.

Offensichtlich wird bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen trotz Antikörper-Gabe ausreichend OVA durch den OT-I Zellangriff aus dem ZNS freigesetzt, um eine Depletion der CD8^+ T-Zellen hervorzurufen.

4.7 Zusammenfassung der Therapie der CD8^+ T-Zell vermittelten EAE mit 25-D1.16

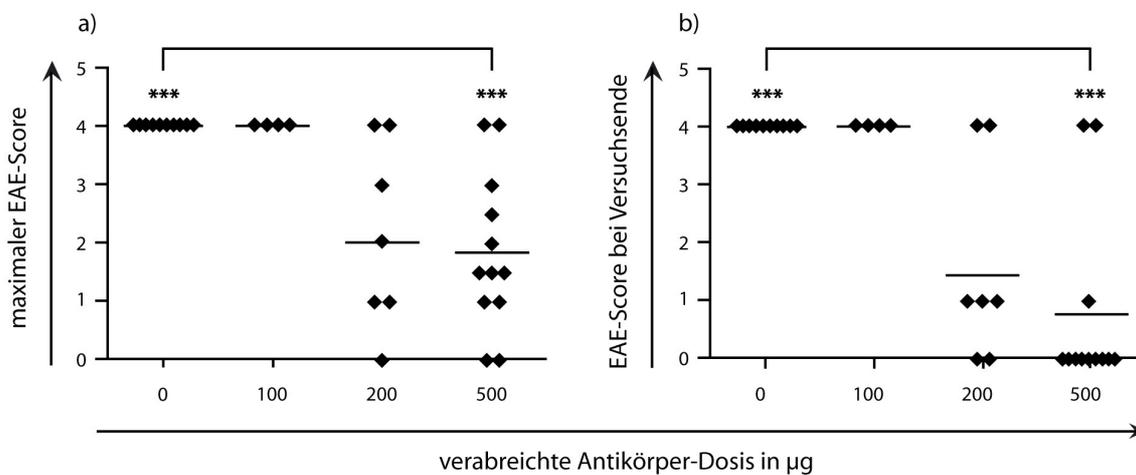


Abb. 4.22 500 μg 25-D1.16 reduzieren hochsignifikant Schweregrad der EAE und Letalität. x-Achse: verabreichte Dosis des Antikörpers 25-D1.16 in μg . Diagramm a) zeigt den maximal erreichten EAE-Score im Verlauf der Erkrankung, in Diagramm b) ist auf der y-Achse der EAE-Score bei Versuchsende aufgetragen. Mit $\geq 200 \mu\text{g}$ 25-D1.16 wird der Schweregrad der EAE hochsignifikant gemildert. 75% der mit 500 μg therapierten ODC-OVA/OT-I Mäuse wiesen zum Zeitpunkt der Organentnahme keinerlei Symptomatik einer EAE mehr auf. *** = $p < 0001$.

Abbildung 4.22.a zeigt den maximalen klinischen Wert auf der EAE-Scala, der von den Tieren nach Therapie mit 0, 100, 200 und 500 μg 25-D1.16 erreicht wurde. In Abbildung 4.22.b ist der EAE-Score zum Zeitpunkt der Organentnahme nach Therapie angegeben. Während eine Dosis von 100 μg nicht ausreichend war, um ODC-OVA/OT-I doppelt transgene Tiere vor einem tödlichen Verlauf der Erkrankung zu schützen, konnte der Krankheitsverlauf durch die Applikation von 200 μg 25-D1.16 in 60% der Fälle gemildert werden. Bei zwei von sieben Tieren wurde der Ausbruch der EAE vollständig unterdrückt. Insgesamt sank die Letalität um über 70%.

Durch die Behandlung mit 500 µg 25-D1.16 wurde die Letalität um ca. 83% von 100% auf ca. 17% gesenkt, wobei acht von zwölf Tieren passager erkrankten und zwei von zwölf Tieren keinerlei Symptome einer EAE entwickelten. 75% der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäuse zeigten zum Zeitpunkt der Organentnahme keinerlei Symptomatik einer EAE.

Der Antikörper 25-D1.16 zeigte demnach einen durchschlagenden therapeutischen Effekt bei der Prävention und Behandlung der CD8 T-Zell vermittelten EAE im ODC-OVA/OT-I transgenen Mausmodell.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte somit gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper 25-D1.16 mit Spezifität für den Komplex aus dem OVA-8-Peptid SIINFEKL und dem MHC-I-Molekül nicht nur in vitro durch Blockade der Antigenerkennung inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von OT-I transgenen T-Zellen ausübt, sondern darüber hinaus in vivo sowohl Einfluss auf die Letalität, als auch auf den Schweregrad der Symptome der EAE hat.

In den Versuchen an ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen hatte eine einmalige Dosis von mehr als 200 µg 25-D1.16 sowohl einen präventiven Effekt, als auch mildernde Wirkung auf den Krankheitsverlauf.

5 Diskussion

5.1 Blockade der Antigenerkennung der OT-I Zellen durch den Antikörper 25-D1.16 in vitro

Durch FACS-Färbung und fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass der aufgereinigte monoklonale Antikörper 25-D1.16 den Komplex aus dem von Ovalbumin abgeleiteten Peptid SIINFEKL und dem murinen MHC-I-Molekül H-2K^b mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert (Porgador et al., 1997). Sensitivität und Spezifität von 25-D1.16 entsprechen dabei Sensitivität und Spezifität eines T-Zell Rezeptors, der ebenfalls diese Peptid:K^b-Kombination erkennt (Messaoudi et al., 1999; Porgador et al., 1997). Dies, verbunden mit einer hohen Affinität des Antikörpers (Mareeva et al., 2004), ist Voraussetzung dafür, dass 25-D1.16 mit einem OVA-spezifischen T-Zell Rezeptor (OT-I TCR) um die Bindung an die gemeinsame Zielstruktur konkurrieren und damit die Aktivierung von OT-I Zellen blockieren kann.

Als Indikatoren für den funktionellen Zustand der OT-I Zellen wurden die Expression des Aktivierungsmarkers CD69, die Proliferationsrate, sowie die IFN- γ Sekretion gewählt. Ein Anstieg dieser drei Parameter korreliert mit einer zunehmenden Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten.

Zunächst wurde ein in vitro-Modell herangezogen, in dem OT-I Zellen zusammen mit dem stimulierenden Peptid und 25-D1.16 kultiviert wurden. Da Antigen-präsentierende Zellen in diesem Setting fehlen, werden hier OT-I Zellen mit SIINFEKL beladen und bieten sich das Peptid gegenseitig dar.

Bei der Messung der Aktivierungsparameter wurde eine hochsignifikante Reduktion beobachtet, was für einen deutlichen blockierenden Effekt des Antikörpers 25-D1.16 spricht. Entgegen der Erwartungen wurde diese Reduktion jedoch nicht bei den höchsten der getesteten, sondern bei mittleren 25-D1.16-Konzentrationen gemessen. Bei hohen Antikörper-Konzentrationen wurde eine verstärkte T-Zellaktivierung festgestellt.

Bei der Interpretation dieser biphasischen Dosis-Wirkungskurve sind zwei Überlegungen möglich.

Zum einen wäre es denkbar, dass aufgrund der höheren Antikörper-Konzentration ein Ungleichgewicht zwischen auf der Zelloberfläche vorhandenen Peptid:H-2K^b-Komplexen und den sich in Lösung befindenden Antikörpern besteht. Nicht jeder

Antikörper kann daher mit beiden Fab-Armen eine Bindung eingehen. Dies führt zu einer Verminderung der Avidität (Gesamtenergie einer multivalenten, bzw. im Falle von IgG-Antikörpern divalenten Bindung zwischen Antigen und Antikörper). Die Bindung an die Zielstruktur ist also „weniger stabil“ und die blockierende Wirkung des Antikörpers gegenüber dem OT-I TCR sinkt.

Mit diesem Ansatz wäre zu erklären, dass Proliferation und Zytokin-Ausschüttung bei hohen 25-D1.16-Konzentrationen die gleichen Werte erreichen, wie bei sehr niedrigen Antikörper-Konzentrationen. Unbegründet bliebe, warum die Werte die Proliferation bei einer 25-D1.16-Konzentration von 0 ng/ml übersteigen.

In der Vergangenheit zeigten verschiedene Forschergruppen, dass MHC-I-Moleküle neben ihrer Aufgabe der Antigen-Präsentation auch der Signaltransduktion dienen. Je nach Zelltyp und bindendem Antikörper kann das durch MHC-I-Moleküle vermittelte intrazelluläre Signal u.a. zur Aktivierung der Zellen führen (Ruhwald et al., 1999). Speziell für T-Zellen wurden stimulatorische Effekte einer MHC-I-medierten Signaltransduktion mit damit einhergehender erhöhter Proliferationsrate und Zytokin-Produktion beobachtet (Geppert et al., 1989). Dieser aktivierende Effekt einer Antikörperbindung an MHC-I-Moleküle ist spezifisch und dosisabhängig (Turco et al., 1988).

Die soeben erläuterten Mechanismen könnten die bei hohen 25-D1.16-Konzentrationen gemessenen „überhöhten“ Aktivierungsparameter der OT-I T-Lymphozyten erklären.

Das beschriebene Modell ist aber insofern weniger wirklichkeitsgetreu, als OT-I Zellen hier gleichzeitig als antigen-präsentierende und als Effektorzellen fungieren.

Die OT-I Zellen wurden deshalb in einem zweiten Zellsetting in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen durch EG.7-OVA Zellen ersetzt, die SIINFEKL endogen produzieren und über MHC-I-Proteine präsentieren. Eine vermehrte Aktivierung der OT-I Zellen – hier nurmehr Responder-Zellen – bei hohen 25-D1.16 Konzentrationen wurde nicht mehr beobachtet.

In Gegenwart des blockierenden Antikörpers konnten sowohl CD69-Expression, als auch Proliferation und IFN- γ -Produktion der OT-I Zellen hochsignifikant, z.T. sogar auf nicht nachweisbare Werte, supprimiert werden.

EG.7-OVA Zellen tragen ca. 90 SIINFEKL:H-2K^b Komplexe auf ihrer Oberfläche (Malarkannan et al., 1995; Rotzschke et al., 1991). Das Modell, in dem EG.7-OVA

Zellen das antigene Peptid in geringer Anzahl darbieten, ist der in vivo Situation in dem ODC-OVA/OT-I Mausmodell gut angepasst, da SIINFEKL hier von Oligodendrozyten ebenfalls in geringer Dichte präsentiert wird (siehe Kap. 4.4).

Aufgrund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse in diesem Zell-Setting in Bezug auf die Wirkung von 25-D1.16 in der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE aussagekräftiger sind.

5.2 Effekt von 25-D1.16 in der CD8⁺ T-Zell mediierten EAE bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen

Auch als Therapiestrategie in der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen hatte der monoklonale Antikörper 25-D1.16 durchschlagenden Effekt.

In einem präventiven Ansatz konnten durch die Verabreichung 200 µg des Antikörpers 71,4% der Mäuse vor dieser letal verlaufenden Erkrankung geschützt werden. Bei Gabe von 500 µg 25-D1.16 war die Therapie sogar bei über 83% der Tiere erfolgreich.

Ein Teil der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tiere blieb nach Applikation des Antikörpers völlig gesund, während bei einem anderen Teil der Ausbruch der EAE zwar nicht vollständig verhindert werden konnte, der Schweregrad aber deutlich gemildert wurde.

Der Effekt der Antikörpertherapie war nicht nur klinisch, sondern auch histopathologisch überzeugend. Nach Therapie zeigte sich in den Gewebeschnitten ein weitgehend bis komplett intaktes Zentralnervensystem mit im Vergleich zu unbehandelten Mäusen drastisch reduzierter OT-I Zell- und Makrophagen/Mikroglia-Infiltration. Die Tatsache, dass auch transient erkrankte Tiere bei Versuchsende kaum noch demyelinisierte Areale aufwiesen, spricht dafür, dass während der Erholungsphase eine Remyelinisierung der Axone auftritt. Diese Fähigkeit zur Neubildung von Markscheiden im Rahmen reparativer Vorgänge ist auch bei Patienten mit Multipler Sklerose bekannt (Patani et al., 2007; Patrikios et al., 2006).

Wie unter Punkt 4.6.4.1 beschrieben, starben zwei der zwölf mit 500 µg 25-D1.16 behandelten doppelt transgenen Mäuse unerwartet. Sie hatten sich nach initial

ausgeprägter EAE erholt und zeigten vor ihrem Tod nur noch geringe neurologische Restsymptomatik in Form einer leichten Gangataxie.

Aufgrund täglicher, eingehender Beobachtung der Tiere und ihres Sozialverhaltens wird vermutet, dass die mit der Erkrankung einhergehende Wachstumsretardierung sowie die verbleibende Unsicherheit beim Laufen ausschlaggebend für den Tod waren. Die beiden vorübergehend schwer erkrankten Mäuse hatten im Konkurrenzkampf mit den sieben gesunden oder nur leicht erkrankten Tieren des Wurfes einen klaren Nachteil beim Zugang zu Muttermilch. Es ist somit wahrscheinlich, dass die beiden Tiere nicht direkt an der Erkrankung, sondern vielmehr an dem sich aus den Folgen der durchgemachten EAE ergebenden Selektionsnachteil verstarben.

Da der Antikörper 25-D1.16 eine begrenzte Halbwertszeit hat, schien es möglich, dass die EAE nach seinem Abbau durch die dann wegfallende Blockade der Antigenerkennung durch OT-I Zellen erneut ausbricht. Es wurde deshalb die Hälfte der erfolgreich therapierten ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäuse drei Monate lang nachbeobachtet.

In dieser Nachbeobachtungszeit trat jedoch bei keinem der Tiere ein Rezidiv der EAE auf. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass sich die zuvor noch unzureichend entwickelte Blut-Hirn-Schranke der Jungtiere im Alter von knapp zwei Wochen vollständig schließt und OT-I Zellen somit keinen Zugang mehr zu dem ausschließlich auf Oligodendrozyten vorhandenen Ovalbumin-Peptid haben (Na et al., 2008) (siehe Kap. 1.2.4.2).

Diese Hypothese wird unterstützt von Experimenten, bei denen CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester) -markierte OT-I Zellen in ODC-OVA einzeln transgene Mäuse transferiert wurden (Na et al., 2008). Waren die ODC-OVA Mäuse beim Zelltransfer maximal 10 Tage alt, so wurde eine starke Proliferation der OT-I Zellen beobachtet. Erfolgte der Zelltransfer am 12. Lebenstag oder später, wurden die OT-I Zellen nicht mehr aktiviert und es wurde keine Zellteilung gemessen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich die Blut-Hirn-Schranke der Mäuse im Alter von fast zwei Wochen schließt und die naiven OT-I Zellen somit die Oligodendrozyten im ZNS, d.h. den Ort ihrer initialen Aktivierung, nicht mehr erreichen können.

5.3 Neuere Experimente mit 25-D1.16

Um das in vitro-Modell den Gegebenheiten in vivo im ODC-OVA/OT-I Mausmodell noch einen weiteren Schritt anzunähern, wurden SIINFEKL-präsentierende Oligodendrozyten einbezogen. Im Folgenden werden Ergebnisse von Experimenten beschrieben, die von Frau Dr. Na aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hünig am Institut für Immunbiologie und von der Arbeitsgruppe von Prof. Wiendl an der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt wurden.

In einer Co-Kultur von OVA-transgenen Oligodendrozyten und OT-I Zellen wurde die Lyse der Oligodendrozyten durch die zytotoxischen T-Zellen in Anwesenheit von 25-D1.16 vollständig gehemmt (Na et al., 2009).

Zudem wurde bewiesen, dass der Antikörper 25-D1.16 die Aktivierung der OT-I Zellen durch Oligodendrozyten aus ODC-OVA Mäusen blockiert. Hierzu wurden OT-I Zellen und Oligodendrozyten ODC-OVA Mäusen unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von 25-D1.16 vier Tage lang co-kultiviert und anschließend per FACS-Analyse die Induktion des Aktivierungsmarkers CD69 gemessen. Bei Zugabe hoher Konzentrationen von 25-D1.16 (20 µg/ml) wurde die Aktivierung der OT-I Zellen durch die OVA transgenen Oligodendrozyten vollständig blockiert (Na et al., 2009).

In einem weiteren in vitro Ansatz, der die komplexe Architektur des Gehirns berücksichtigt, wurden aktivierte OT-I Zellen auf Gewebeschnitte lebenden Gehirns von ODC-OVA transgenen Mäusen aufgebracht. OT-I Zellen sind in diesem Setting in der Lage, in Arealen mit Antigen-Expression durch Oligodendrozyten zu akkumulieren (Gobel et al., 2009) und die Apoptose der Antigen-tragenden Oligodendrozyten zu induzieren, was sich anhand erhöhter Konzentration zytosolischer Caspase-3 nachweisen lässt (Gobel et al., 2009; Na et al., 2009). Durch den Zusatz von 10 µg/ml 25-D1.16 in das Kulturmedium wurde die Anzahl der Caspase-3⁺ Oligodendrozyten in den Gewebeschnitten des ZNS der ODC-OVA Mäuse signifikant reduziert (Na et al., 2009).

In vivo ließ sich nachweisen, dass 25-D1.16 die Proliferation von OT-I Zellen in ODC-OVA transgenen Mäusen verhindert. CFSE-markierte OT-I Zellen wurden ODC-OVA transgenen Mäusen am 7. Lebenstag verabreicht, zusammen mit 500 µg 25-D1.16 oder einem Isotyp-Kontrollantikörper. Nur bei den Mäusen, die den Kontrollantikörper erhalten hatten, ließ sich drei Tage später eine Proliferation der OT-I Zellen

nachweisen, wohin gegen die gleichzeitige Injektion des Antikörper 25-D1.16 die Proliferation der OT-I Zellen verhinderte (Na et al., 2009).

Um zu untersuchen, ob 25-D1.16 in vivo auch einen kurativen Effekt hat, wurde der Antikörper ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen nicht nur präventiv, sondern auch nach initialem Ausbruch der EAE verabreicht (Na et al., 2009). ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäuse wurden in den EAE-Stadien 2 und 4 500 µg 25-D1.16 intraperitoneal appliziert. Während Mäuse im Stadium 4 (n = 3) in den Tagen nach der Behandlung keine Besserung zeigten und eingeschläfert werden mussten, erholten sich 7 von 12 Mäusen im Stadium 2 nach vorübergehender Exazerbation. 5 der 12 Mäuse erlitten trotz Therapie einen schweren Verlauf und wurden eingeschläfert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass 25-D1.16 nicht nur den Ausbruch der EAE bei ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen verhindern kann. Die Erkrankung lässt sich zudem, zumindest in einem Teil der Fälle, therapieren, wenn die Tiere bereits erste Krankheitssymptome zeigen.

Die Möglichkeit, den Antikörper nicht nur präventiv, sondern auch kurativ einsetzen zu können ist im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Multiplen Sklerose wichtig, da hier aufgrund mangelnder Vorhersagbarkeit der Erkrankung keine Prävention möglich ist.

5.4 Monoklonale Antikörper mit Spezifität für Peptid:MHC-Klasse-II Komplexe

Neben 25-D1.16 existieren einige weitere monoklonale Antikörper, die ein bestimmtes Peptid, gebunden an ein MHC-Molekül erkennen. Der murine monoklonale Antikörper Y-Ae detektiert das Selbst-Peptid E α_{52-68} , ein Fragment der α -Kette des MHC-II-Moleküls I-E im Kontext mit dem MHC-II-Molekül I-A^b (Rudensky et al., 1991b). Wie ein T-Zell Rezeptor bindet er gleichzeitig sowohl an Peptid-, als auch an MHC-II-Ketten mit hoher Affinität (Murphy et al., 1992).

Ähnlich wie 25-D1.16 in Bezug auf OT-I Zellen, kann Y-Ae in vitro mit E α_{52-68} :I-A^b spezifischen CD4⁺ T-Zellen konkurrieren und die Erkennung des Antigens durch die CD4⁺ T-Zellen blockieren (Murphy et al., 1992; Rudensky et al., 1991b).

Erste in vivo-Daten für den monoklonalen Antikörper Y-Ae wurden von Viret und Janeway beschrieben. Y-Ae wurde neugeborenen Mäusen verabreicht, die neben

dem MHC-II-Molekül I-E (und damit dem Selbst-Peptid E α_{52-68} im Komplex mit I-A^b) auch den transgenen CD4⁺ T-Zell Rezeptor 1H3.1 TCR $\alpha\beta$ (V α 1/V β 6) mit Spezifität für ebendiesen Peptid:MHC-II Komplex exprimieren (Viret and Janeway, 2000). Bei doppelt transgenen Tieren findet eine massive negative Selektion sowohl von unreifen CD4⁺CD8⁺ E α_{52-68} :I-A^b spezifischen Thymozyten, als auch von reifen Thymozyten (V β 6^{high}CD4⁺CD8⁻) statt.

Durch wiederholte intraperitoneale Injektion des gereinigten Antikörpers Y-Ae ab dem 2. Lebenstag, konnte der intrathymische Prozess der negativen Selektion 1H3.1 TCR transgener Thymozyten blockiert werden. Auch die Größe und Zellzahl des Thymus, sowie die Zahl V β 6⁺CD4⁺ T-Zellen in der Milz war im Vergleich zu unbehandelten doppelt transgenen Tieren deutlich erhöht. Letzteres spricht dafür, dass Y-Ae nicht nur vor negativer Selektion im Thymus schützt, sondern auch die periphere Depletion autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen verhindert. Die Depletion ist hier, wie bereits in Kap. 3.5 erläutert, Marker dafür, inwieweit autoreaktive T-Zellen ihr Antigen erkennen und aktiviert werden.

Die verminderte negative Selektion von 1H3.1 TCR transgenen Thymozyten in Anwesenheit des Antikörpers Y-Ae ist Folge der reduzierten Verfügbarkeit des E α_{52-68} :I-A^b Komplexes aufgrund der Konkurrenz der beiden Immunrezeptoren (Viret and Janeway, 2000).

Im Aufbau ähnelt dieses Experiment dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch, die negative Selektion der reifen CD8⁺ T-Zellen in ODC-OVA/OT-I transgenen Mäusen durch Gabe von 25-D1.16 zu modulieren. Negative Selektion findet bei diesen Mäusen nur statt, wenn sie erkranken, d.h. sie lässt sich bei noch gesunden (weniger als 10 Tage alten) Tieren nicht nachweisen. Ebenso wenig findet eine negative Selektion in den seltenen Fällen statt, in denen es bei den Mäusen trotz Vorhandensein beider Transgene nicht zur Erkrankung kommt.

Wie in Kap. 4.6.4.5 beschrieben, konnte die negative Selektion der OVA-reaktiven T-Zellen bei ODC-OVA/OT-I transgenen Mäusen durch 25-D1.16 nicht blockiert werden. Jedoch bleibt hervorzuheben, dass der Antikörper Y-Ae von Viret und Janeway mehrmals (insgesamt 8x) appliziert wurde und dass das Antigen in diesem Modell im Thymus exprimiert wird, was in unserem Tiermodell nicht der Fall ist. Dies sind zwei mögliche Gründe, warum Viret und Janeway in ihren Versuchen eine Blockade der negativen Selektion gelang.

Weitere in vivo-Versuche zur Untersuchung der blockierenden Wirkung von Y-Ae auf die Proliferation $E\alpha_{52-68}:I-A^b$ spezifischer $CD4^+$ T-Zellen wurden von Yarke et al. durchgeführt.

In adoptiven Transfer-Experimenten wurden CD57BL/6 Mäusen CFSE-markierte $CD4^+$ T-Zellen, die das Peptid $E\alpha_{52-68}$, präsentiert von $I-A^b$ -Molekülen erkennen, sog. TEa $CD4^+$ T-Zellen, injiziert. Gleichzeitig wurden 100 μ g des antigenen Peptids zusammen mit LPS (Lipopolysaccharid) verabreicht, um eine klonale Expansion der spezifischen T-Zellen hervorzurufen. Durch Injektion des Antikörpers Y-Ae wurde die Erkennung des Peptid:MHC-Komplexes durch die T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten blockiert. Erfolgte die Antikörper-Gabe zeitgleich mit der Immunisierung mit dem Peptid $E\alpha_{52-68}$, so wurde die Proliferation der $E\alpha_{52-68}:I-A^b$ spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nach 120 Stunden um 95% reduziert. Die Neutralisation des $E\alpha_{52-68}:I-A^b$ Komplexes durch Y-Ae zu späteren Zeitpunkten hatte einen abnehmenden inhibitorischen Effekt.

Die Blockade der Antigenerkennung führt also zu einem sofortigen Stopp der $CD4^+$ T-Zell Proliferation. Grund hierfür ist nicht der fehlende Eintritt in den Zellzyklus (G_0 -Phase \rightarrow G_1 -Phase), sondern ein verlangsamter Übertritt von der G_1 -Phase in die $S/G_2/M$ Phase. Je größer die Konkurrenz um Peptid/MHC-Komplexe, desto drastischer ist der Abfall der Proliferation. Auch nach initialer Stimulation verringern die T-Zellen ihre Zellteilungsrate, sobald das Antigen nicht mehr detektiert werden kann (Yarke et al., 2008).

5.5 Immunmodulation durch Peptid:MHC-Klasse-II spezifische Antikörper in einem $CD4^+$ T-Zell vermittelten EAE-Modell

Während der inhibitorische Effekt des monoklonalen Antikörpers Y-Ae auf die Proliferation von spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nie therapeutisch genutzt wurde, wurden andere Peptid:MHC-Klasse-II spezifische Antikörper von Aharoni et al. erfolgreich in der Therapie einer $CD4^+$ T-Zell vermittelten EAE eingesetzt (Aharoni et al., 1991).

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen sind neben den in dieser Arbeit geschilderten Experimenten die einzigen Daten zur antigenspezifischen Therapie einer Autoimmunerkrankung mittels Peptid:MHC-spezifischer Antikörper.

Die aus Hybridom-Zelllinien isolierten monoklonalen IgM Antikörper A-10-12, B-7-1, B-18-7 und C-34-72 erkennen ein antigenes Peptid der Myelinkomponente MBP, im Komplex mit dem murinen MHC-II-Molekül I-A^s.

In vitro wurde mittels FACS-Analyse im Gegensatz zu der hohen Spezifität von 25-D1.16 (Messaoudi et al., 1999; Porgador et al., 1997) eine nur in 10-15% spezifische Bindung der Antikörper an ihre Zielstruktur festgestellt. Ein funktioneller Assay mit Komplement-vermittelter Zytotoxizität ergab 11.4-15.9% spezifische Lyse der Zielzellen und bestätigte damit das Ergebnis der zuvor genannten FACS-Analyse.

In vivo jedoch war die Blockade der T-Zell Antwort durch anti-MBP/I-A^s Antikörper in Mäusen, die zuvor mit MBP immunisiert worden waren, effizient. Auch die humorale Immunantwort in Form von Antikörper-Produktion gegen MBP wurde reduziert.

Als nächstes untersuchten Aharoni et al. den Effekt der anti-MBP/I-A^s Antikörper auf die Symptomentwicklung in einer CD4⁺ T-Zell vermittelten EAE. Diese wurde zum Zeitpunkt 0 induziert durch Injektion von lyophilisiertem Rückenmark-Homogenat oder aufgereinigtem MBP in CFA gefolgt von der Injektion von Pertussis-Toxin. Die Antikörper wurden zwischen den Tagen -2 und +9 vor bzw. nach Immunisierung insgesamt neunmal intraperitoneal verabreicht. Drei der Antikörper (B-7-1, B-18-7 und C-34-72) konnten die Symptomentwicklung fast vollständig verhindern. Der maximal erreichte mittlere EAE-Score betrug 0,5.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Tiere der Negativkontroll-Gruppe, die nicht mit blockierenden Antikörpern behandelt wurden, höchstens das EAE-Stadium 2 (Paralyse eines Hinterlaufes) erreichten und sich danach auch ohne Therapie wieder erholten.

Im Vergleich zu der bei ODC-OVA/OT-I beobachteten fulminanten EAE, die innerhalb von ca. 4 Tagen zum Tod führt, ist also diese CD4⁺ T-Zell vermittelte EAE durch einen wesentlich milderen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass zur Therapie dieser milden EAE ein weniger potenter Peptid/MHC-spezifischer Antikörper als 25-D1.16 ausreichend war.

Auch die Tatsache, dass die anti-MBP/I-A^s Antikörper wiederholt injiziert wurden, könnte zum Therapieerfolg beigetragen haben.

Dennoch waren die beschriebenen Versuche ein erster Hinweis darauf, dass Antigen/MHC-spezifische Antikörper in Zukunft in der Therapie der EAE und anderer Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnten.

5.6 Weitere Möglichkeiten der Interferenz mit der Antigenerkennung in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen

Eine weitere antigenbasierte Möglichkeit, die Aktivierung von spezifischen T-Zellen durch Peptid:MHC-I Komplexe zu modulieren sind sog. veränderte Peptidliganden („altered peptide ligands“, APLs). APLs sind Peptide, deren Struktur der der Autoantigene sehr ähnlich, jedoch nicht identisch ist. APLs können nach Bindung am T-Zell Rezeptor als Agonisten, partielle Agonisten und Antagonisten fungieren und die nach Rezeptorbindung ablaufende Signaltransduktions-Kaskade und damit die T-Zell-Antwort verändern (Germain and Stefanova, 1999). Antagonistische Peptidvarianten können auf diese Weise in vitro das Zytokinprofil von reifen Immunzellen modulieren und T-Zell-Anergie auslösen (De Magistris et al., 1992; Sloan-Lancaster et al., 1993).

Durch Verwendung eines von MBP durch Austausch einer einzelnen Aminosäure abgeleiteten APLs konnte in einem CD4⁺ T-Zell vermittelten EAE-Modell nicht nur der Ausbruch der Erkrankung verhindert, sondern die EAE auch nach initialem Auftreten erster Symptome therapiert werden (Smilek et al., 1991).

Auch für SIINFEKL gibt es solche antagonistischen Peptidvarianten. Während das antigene Peptid SIINFEKL in fetalen Thymus-Organokulturen (fetal thymic organ culture, FTOC, (Hogquist et al., 1993) zur negativen Selektion von Thymozyten, die den OT-I TCR exprimieren, führt, induzieren diese Peptidvarianten positive Selektion von OT-I Thymozyten (Hogquist et al., 1994).

Die APLs können darüber hinaus auch reifen OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ein anergisierendes Signal vermitteln. Aufgrund ihrer Fähigkeit der Inhibition der zytotoxischen Aktivität von OT-I Zellen wurden mehrere antagonistische Peptide identifiziert.

Die SIINFEKL-Varianten V-OVA (Aminosäuresequenz RGYNYEKL) und R4 (Aminosäuresequenz SIIRFEKL) sind reine Antagonisten. E1 (EEINFEKL) zeichnet sich durch eine höhere Affinität aus, ist jedoch ein gemischt antagonistisch/agonistisches Peptid, das in niedrigen Konzentrationen antagonistisch, in hohen Konzentrationen agonistisch wirkt. Auch P7 (SIINFEPL) ist ein starker Antagonist am TCR reifer OT-I Zellen, obwohl er ein nur schwaches Potenzial zur Induktion positiver Selektion von Thymozyten besitzt (Hogquist et al., 1994). Obige Erläuterungen machen APLs zu interessanten Kandidaten für eine

antigenselektive Immuntherapie der CD8⁺ T-Zell medierten EAE bei ODC-OVA/OT-I transgenen Mäusen. Im Hinblick darauf sollte zunächst *in vitro* untersucht werden, ob die antagonistischen Peptide die T-Zell Aktivierung ebenso effektiv wie der Antikörper 25-D1.16 blockieren können. Hierzu würde sich erneut eine Co-Kultur aus EG.7-OVA Zellen, OT-I Zellen und dem jeweiligen Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen anbieten. Anschließend müsste man anhand der drei in dieser Arbeit beschriebenen Aktivierungsparameter den funktionellen Zustand der OT-I Zellen bestimmen.

In vivo sollte versucht werden, den Ausbruch der Erkrankung in ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen durch intraperitoneale Injektion der antagonistischen Peptide zu modulieren. Als nächster Schritte könnte mit den APLs ein Therapieversuch der EAE nach dem Auftreten erster Symptome unternommen werden.

Es bleibt zu erwähnen, dass antagonistische Peptide ihren inhibitorischen Effekt nur ausüben, wenn sie in großem Überschuss vorliegen (De Magistris et al., 1992; Jameson et al., 1993).

Außerdem sollte bedacht werden, dass APLs unter bestimmten Umständen enzephalitogene T-Zellen auch stimulieren können. So führte eine Studie mit dem von dem immundominanten Protein MBP abgeleiteten APL CGP77116 (Aminosäuren 83-99) bei einigen MS-Patienten aufgrund von Kreuzreaktivität zu einer drastischen Vermehrung MPB-spezifischer autoaggressiver T-Zellen, einhergehend mit einer erheblichen Symptomverschlechterung (Bielekova et al., 2000).

Darüber hinaus können Autoimmunerkrankungen im Verlauf, z.B. durch Erweiterung des Epitopspektrums („epitope spreading“) (Bischof et al., 2004; Fujinami et al., 2006; McMahon et al., 2005) einer Therapie mit APLs unzugänglich werden.

Auf der anderen Seite zeigte eine weitere Phase II Studie, dass man durch die Verabreichung von APLs in niedriger Dosis die T-Zell Antwort in Richtung Th2-vermittelter, antientzündlicher Prozesse verschieben kann (Kappos et al., 2000). Obwohl diese Studie wegen systemischer Überempfindlichkeitsreaktionen bei 9% der Patienten abgebrochen wurde, zeigt sie, dass APLs prinzipiell auch beim Menschen antiinflammatorische Wirkung entfalten können.

5.7 Regulatorische vs. pathogene Funktion der CD8⁺ T-Zellen in EAE und MS

Lange Zeit wurden fast ausschließlich CD4⁺ T-Zellen für die Immunpathogenese der Multiplen Sklerose verantwortlich gemacht (Steinman, 1996). Bestimmte MHC-Klasse-II Allele, wie HLA-DR2, wurden als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer MS identifiziert (Olerup and Hillert, 1991) und es wurden MBP-spezifische T-Helfer-Zellen im Zentralnervensystem von Patienten mit Multipler Sklerose gefunden (Oksenberg et al., 1993). Weitere Anhaltspunkte kamen von klassischen EAE-Modellen, in denen die Injektion von Geweben des ZNS zur Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten führt.

Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen bei MS-Patienten verbesserte jedoch weder Schubrate, noch mittels MRT gemessene Entzündungsaktivität (Babbe et al., 2000; van Oosten et al., 1997). Andere gegen CD4⁺ T-Zellen gerichtete Therapiestrategien führten sogar zur Verschlechterung der Erkrankung (Friese and Fugger, 2005).

Seit einigen Jahren richtet sich das Augenmerk der Forschung nun zunehmend auch auf die Rolle der CD8⁺ T-Zellen in der Pathogenese der MS. Diese ist momentan Gegenstand kontroverser Diskussion. Grund hierfür sind u.a. die widersprüchlichen Daten zur Funktion der CD8⁺ T-Lymphozyten in verschiedenen EAE-Modellen.

5.7.1 CD8⁺ T-Zellen als Suppressor-Zellen in der EAE

1992 wurde zunächst eine regulatorische Funktion von CD8⁺ T-Zellen in einem EAE-Modell beobachtet (Jiang et al., 1992). CD8⁺ T-Lymphozyten schützen in diesem Modell vor Rezidiven der EAE. Diese initiale Beobachtung wurde durch Versuche bestätigt, in denen aus Mäusen, die eine EAE durchgemacht und sich wieder erholt hatten, CD8⁺ T-Zellen isoliert und in Empfänger-Mäuse transferiert wurden, die mit MBP immunisiert worden waren. Mäuse, denen diese CD8⁺ T-Zellen übertragen wurden, erwiesen sich als resistent gegenüber einer MPB-induzierten EAE (Jiang et al., 1992).

Einblick in den Mechanismus, mit dem suppressorische CD8⁺ T-Lymphozyten die Immunantwort verhindern können, gab die Entdeckung, dass diese Zellen einen MHC-Klasse-I Qa-1 restringierten T-Zell Rezeptor exprimieren (Jiang et al., 1992). Qa-1 gehört nicht zu den klassischen MHC-I-Molekülen. Es ist das murine Homolog des menschlichen HLA-E-Moleküls und wird von einigen pathogenen CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Es wird angenommen, dass CD8⁺ regulatorische T-Zellen Peptide

erkennen, die ihnen von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von Qa-1 präsentiert werden (Kumar, 2004). Nach klonaler Expansion der CD8⁺ regulatorischen T-Zellen werden die autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen apoptotisch (Madakamutil et al., 2003). Bestätigung für dieses Modell kam von Experimenten mit Q1-a Knockout Mäusen. Die Induktion einer EAE in Q1-a Knockout Mäusen führte zu einer übersteigerten sekundären, nicht jedoch primären CD4⁺ T-Zell Antwort gegenüber Fremd- oder Selbst-Peptiden und damit zu einem schwereren Verlauf der EAE. Dadurch wurde bewiesen, dass CD8⁺ T-Suppressor-Zellen in diesem Modell nötig sind, um die autoimmune CD4⁺ T-Zell Antwort zu modulieren (Aboul-Enein et al., 2004).

Auch in anderen EAE-Modellen üben CD8⁺ T-Zellen eine regulatorische Funktion aus. Linker et al. untersuchten den Krankheitsverlauf bei β 2-Mikroglobulin Knockout Mäusen, bei denen wegen Fehlen des MHC-I-Moleküls keine Entwicklung von CD8⁺ T-Zellen stattfindet. Sowohl die Injektion von MOG₃₅₋₅₅, als auch von MBP führte bei diesen Tieren zu einer ausgeprägteren EAE, als bei Wildtyp-Mäusen (Linker et al., 2005). Obwohl bezüglich dieses Modells einige Unklarheiten bestehen (Friese and Fugger, 2005) spricht diese Tatsache für eine regulatorische Rolle der CD8⁺ T-Zellen.

Weiss und Mitarbeiter berichten über eine negative Korrelation zwischen Anzahl der CD8⁺ T-Zellen und Schweregrad der EAE bei C57/BL6 Mäusen, die mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert wurden (Weiss et al., 2007).

Darüber hinaus wurden in einer weiteren Studie antigen-spezifische, CD8⁺CD28⁻ Zellen identifiziert, die nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit APCs toleranz-induzierendes Potential bekommen (Najafian et al., 2003). Diese tolerogenen APCs führen zu einer Anergie antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Transfer von CD8⁺CD28⁻ Zellen in CD8 Knockout Mäuse führte zu Resistenz gegenüber EAE.

Neben einigen anderen Studien, in denen spezielle Funktionen regulatorischer CD8⁺ T-Zellen untersucht wurden (Faunce et al., 2004; Gilliet and Liu, 2002; Montero et al., 2004; Perchet et al., 2004), gibt es Studien, in denen über eine breitere Wirkungsweise von CD8⁺ T-Suppressorzellen durch Produktion immunsuppressiver Zytokine berichtet wird (Filaci et al., 2001; Gilliet and Liu, 2002).

Im Gegensatz zu CD4⁺ regulatorischen T-Zellen, die aufgrund ihrer Expression von CD25 und Foxp3 (Sakaguchi, 2005) mittlerweile recht gut charakterisiert sind, gibt es bis jetzt noch keine bestimmten Marker für regulatorische CD8⁺ T-Zellen außer dem Fehlen der Expression von CD28 (Sun et al., 1988).

5.7.2 CD8⁺ T-Suppressor-Zellen bei Multipler Sklerose

Die Rolle CD8⁺ T-Suppressor-Zellen bei Menschen mit Multipler Sklerose ist schwieriger zu definieren. Einige Erkenntnisse wurden durch Studien an MS-Patienten, die mit Glatirameracetat behandelt wurden, gewonnen. Dieses für die Therapie der schubförmigen MS zugelassene Medikament soll die Anergie von CD4⁺ T-Zellen fördern (Dhib-Jalbut, 2003). Es hat sich jedoch gezeigt, dass durch Behandlung mit Glatirameracetat auch die CD8⁺ T-Zell-Antwort reduziert wurde. Teil des Therapieeffektes könnte also durch eine Modulation der CD8⁺ T-Zellaktivität zustande kommen (Biegler et al., 2006; Karandikar et al., 2002). Die günstige Wirkung von Glatirameracetat korreliert mit dem Vorhandensein eines bestimmten CD8⁺ T-Zell Subtypen. Dieser Subtyp von CD8⁺ T-Zellen kann ex-vivo Glatirameracetat-abhängig CD4⁺ T-Zellen abtöten. Dies zeigt, dass zytolytische Prozesse möglicherweise Ursache des regulatorischen Effektes der CD8⁺ T-Zellen in vivo sein könnten. Die Rolle von HLA-E, dem menschlichen Qa-1 Homolog wurde in diesen Experimenten nicht untersucht.

Auch für die MS existieren nun zwei mögliche Mechanismen der Entzündungsregulation durch CD8⁺ T-Zellen. Die Q1-a bezogenen Experimente an Mäusen und die klinischen Studien mit Glatirameracetat weisen auf eine direkte Elimination von CD4⁺ T-Zellen durch CD8⁺ T-Zellen hin. Eine denkbare Alternative ist ein indirekter Mechanismus, bei dem APCs durch Interaktion mit CD8⁺ T-Zellen die Fähigkeit gewinnen, die CD4⁺ T-Zell Antwort zu inhibieren und dadurch die Entzündungsreaktion zu dämpfen (Johnson et al., 2007).

5.7.3 Pathogene Funktion von CD8⁺ T-Zellen in EAE-Modellen

Im Widerspruch zu beschriebenen Daten stehen Experimente mit EAE-Modellen, in denen CD8⁺ T-Lymphozyten keine regulatorische Funktion ausüben, sondern eindeutig pathogen sind. Neben dem neuen Modell der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäuse, mit dem hier gearbeitet wurde, existieren eine Reihe weiterer solcher EAE-Modelle.

Überzeugende Daten zur Pathogenität von CD8⁺ T-Zellen stammen von zwei Tiermodellen, in denen EAE durch adoptiven Transfer von CD8⁺ T-Lymphozyten ohne die Hilfe von CD4⁺ T-Zellen induziert wurde (Huseby et al., 2001; Sun et al.,

2001). Mit MBP immunisierte C3H-Mäuse zeigten eine klonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch waren für MBP₇₉₋₈₇ gebunden an das MHC-I-Molekül H-2K^k (Huseby et al., 2001; Huseby et al., 1999). Transferierte Zellen führten zu schwerer EAE in Empfänger-Mäusen, die dem klinischen Verlauf der Multiplen Sklerose ähnlicher waren als die konventionelle CD4⁺ T-Zell vermittelte EAE, da die Mäuse Ataxie, Spastik und eine höhere Mortalitätsrate aufwiesen.

In der zweiten Studie wurden C57BL/6 Mäuse mit MOG₃₅₋₅₅ immunisiert (Sun et al., 2001). Nach adoptivem Transfer MOG₃₅₋₅₅/H-2D^b spezifischer CD8⁺ T-Zellen erkrankten Wildtyp-Mäuse an einer schweren EAE, β2-Mikroglobulin Knockout-Mäuse (d.h. MHC-Klasse-I-defizient) blieben jedoch gesund. Die Erkrankung bei Wildtyp-Mäusen mit schubförmigem Verlauf und massiver Infiltration von CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen/Mikroglia und Demyelinisierung wies ebenfalls eine stärkere Ähnlichkeit mit der Multiplen Sklerose auf als konventionelle EAE-Modelle.

Auch das MHC-I-restringierte MOG-Derivat MOG₄₀₋₅₄ verursacht in C57BL/6 Mäusen eine EAE (Sun et al., 2003).

In einer EAE ausgelöst durch das kleine Epitop MOG³⁷⁻⁴⁶ gebunden an H-2D^b (Ford and Evavold, 2005), wurden im Frühstadium der Erkrankung MOG-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifiziert. Sie wurden noch vor Beginn neurologischer Symptome im ZNS nachgewiesen. Außerdem sezernierten sie IFN-γ, nicht jedoch TGF-β oder IL-10, was sie als Effektorzellen, nicht als regulatorische Zellen in dieser MOG-induzierten EAE auswies (Parker et al., 2004).

5.7.4 Pathogenität der CD8⁺ T-Zellen bei Multipler Sklerose

Im Gegensatz zu der spärlichen Datenlage zu der regulatorischen Funktion von CD8⁺ T-Lymphozyten bei Multipler Sklerose, gibt es eine Vielfalt von Daten, die für eine hauptsächlich pathogene Rolle dieser Zellen beim Menschen sprechen. Argumente hierfür sind in Abbildung 5.1 zusammengestellt.

-
- Multiple Sklerose ist mit dem MHC-I-Allel HLA-A*0301 assoziiert
 - In MS-Läsionen exprimieren alle Zellen des Neuroektoderms MHC-Klasse-I Moleküle und stellen daher potenzielle Zielstrukturen für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen dar
 - Verstärkte Migration von CD8⁺ T-Zellen in das Zentralnervensystem im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen
 - Klonale Expansion von CD8⁺ T-Zellen im ZNS, Liquor und Blut von MS-Patienten
 - Im Vergleich zum Blut erhöhte Anzahl von CD8⁺ T-Zellen in MS-Plaques, Anzeichen einer spezifischen Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen im Gehirn von Patienten mit Multipler Sklerose
 - Autoreaktive Myelin-spezifische CD8⁺ T-Zellen können bei MS-Patienten und Gesunden isoliert werden
 - In einigen EAE-Modellen können CD8⁺ T-Zellen die Erkrankung auslösen und zur Pathogenese beitragen
 - Die Zytokin-Effekte (INF- γ , TNF- α) in Tiermodellen der CD8⁺ T-Zell vermittelten EAE entsprechen den beobachteten Zytokin-Effekten bei Multipler Sklerose
-

Abb. 5.1 Argumente für eine pathogene Rolle der CD8⁺ T-Zellen bei Multipler Sklerose.
 Nach (Friese and Fugger, 2005).

Die Erkrankung ist nicht nur mit bestimmten, seit längerer Zeit identifizierten MHC-Klasse-II Allelen wie HLA-DR2 assoziiert. Auch das MHC-Klasse-I Allel HLA-A*0301 stellt eine unabhängige Prädisposition dar, die das Risiko, an MS zu erkranken, verdoppelt (Fogdell-Hahn et al., 2000; Harbo et al., 2004).

Obwohl die Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im Blut nur ca. die Hälfte der Zahl der CD4⁺ T-Zellen beträgt, findet bei Multipler Sklerose eine verstärkte Rekrutierung von CD8-positiven T-Lymphozyten in das Zentralnervensystem statt. CD8⁺ T-Zellen sind in MS Läsionen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen sogar in 10-13 facher Anzahl vorhanden (Babbe et al., 2000; Booss et al., 1983).

In Gehirn, Liquor und Blut von MS-Patienten wurden klonal expandierte CD8-positve T-Zellen nachgewiesen (Babbe et al., 2000; Monteiro et al., 1995; Skulina et al., 2004). Einige Epitope, die von diesen CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, sind bereits identifiziert. Hierzu zählen verschiedene Peptide des MBP, PLP, MAG, MOBP (myelin-associated oligodendrocyte basic protein) (Crawford et al., 2004; Jurewicz et al., 1998; Zang et al., 2004) und das zytosolische Protein Transaldolase, ein Enzym, das an der Energieversorgung bei der Lipidbiosynthese während der Myelinisierung beteiligt ist (Niland et al., 2005). Die Klone persistierten über 2-5 Jahre, was darauf hinweist, dass sie den Phänotyp von Gedächtniszellen aufweisen (Babbe et al., 2000; Skulina et al., 2004).

Die für die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen benötigten MHC-I-Proteine sind im Gehirn ubiquitär vorhanden. Alle Zellen des ZNS, inklusive Oligodendrozyten, Mikroglia, Astrozyten und Neurone exprimieren MHC-I-Moleküle unter inflammatorischen Bedingungen (Hoftberger et al., 2004; Neumann et al., 1995). All

diese Zellen sind daher potenzielle Zielzellen der CD8⁺ T-Zell vermittelten Zytotoxizität. Auch für MS Plaques speziell wurde eine Hochregulation der MHC-I-Moleküle festgestellt (Gobin et al., 2001; Hayashi et al., 1988; Hoftberger et al., 2004; Ransohoff and Estes, 1991). Die Fähigkeit von CD8⁺ T-Zellen, Oligodendrozyten zu lysieren und eine Transsektion von Axonen hervorzurufen, wurde in vitro nachgewiesen (Jurewicz et al., 1998; Medana et al., 2001; Neumann et al., 2002; Ruijs et al., 1990).

Die in MS-Plaques nahe an demyelinisierten Axonen angeordneten CD8⁺ T-Zellen (Neumann et al., 2002) exprimieren Granzym B, welches an der Zytotoxizität gegen Zielzellen entscheidend beteiligt ist. Außerdem sind die mit zytotoxischen Stoffen gefüllten Granula der Zellen in Richtung der Axone ausgerichtet, was für eine zytotoxische Attacke spricht (Neumann et al., 2002).

In diesem Zusammenhang wurde eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der CD8⁺ T-Zellen und dem Ausmaß axonaler Schäden in MS Läsionen beobachtet (Bitsch et al., 2000; Kuhlmann et al., 2002).

Auch der Effekt verschiedener Zytokine wie IFN- γ und TNF- α bei Multipler Sklerose wird durch die CD8⁺ T-Zell vermittelte EAE gut nachgebildet (Friese and Fugger, 2005).

Es gibt also eine ständig wachsende Anzahl an Hinweisen darauf, dass CD8⁺ T-Zellen (bis auf einzelne Subtypen) eine essentielle Rolle bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen. Es existieren hierbei zwei mögliche Mechanismen. Einerseits ist es denkbar, dass CD8⁺ T-Zellen über ihren TCR mit Peptid:MHC-I Komplexen auf Axonen interagieren und diese mittels Ausschüttung von Effektormolekülen direkt schädigen. Die zweite Möglichkeit ist ein indirekter Mechanismus, bei dem CD8⁺ T-Zellen Peptid:MHC-I präsentierende Gliazellen zerstören und die nun ungeschützten Axone durch andere Komponenten der Entzündungsreaktion angegriffen werden (McDole et al., 2006).

Die Tatsache, dass, wie in der CD4⁺ T-Zell Population, auch CD8⁺ regulatorische T-Zellen identifiziert wurden, schließt eine größtenteils pathogene Funktion der CD8⁺ T-Lymphozyten nicht aus. Therapieziel sollte es sein, die zerstörerische Antwort der CD8⁺ T-Effektorzellen einzudämmen und die Wirkung der regulatorischen CD8⁺ T-Zellen zu stärken. In jedem Fall sind weitere Modelle der CD8⁺ T-Zell vermittelten

EAE nötig, um die Aufgaben der einzelnen CD8⁺ T-Zell Populationen endgültig zu klären.

5.8 Die EAE als Modell der Multiplen Sklerose

Obwohl die EAE viele der klinischen, neuropathologischen und immunologischen Aspekte der Multiplen Sklerose nachbilden kann (Babbe et al., 2000), ist sie weit davon entfernt, die Erkrankung perfekt nachzuahmen. Viele neu entwickelte Therapiestrategien erwiesen sich in der EAE als vielversprechend, zeigten aber bei der Testung in der Multiplen Sklerose entweder keinen Effekt oder verschlimmerten gar die Erkrankung (zum Beispiel TNF α -Inhibitoren, The Lenercept MS Study Group and The UBC MS/MRI Analysis Group, 1999).

Grund dafür ist neben dem unzureichenden Verständnis der Pathogenese der MS vor allem die Heterogenität der Erkrankung. Diese findet sich in allen Bereichen der MS, sei es die genetische Prädisposition, der klinische Verlauf, der histologische Aspekt der Läsionen oder das autoimmune Geschehen. EAE-Modelle können letztlich immer nur einen Teilaspekt der Erkrankung nachahmen. Da in der menschlichen Realität aber neben CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Autoantikörpern auch Komponenten des angeborenen Immunsystems wie dendritische Zellen und Makrophagen/Mikroglia (Munz et al., 2005; Prinz et al., 2006; Takeda et al., 2003) an der Pathogenese gemeinsam beteiligt sind, ist es einleuchtend, dass es kein EAE-Modell gibt, dass die Komplexität der Multiplen Sklerose exakt abbilden kann.

Trotz dieser Unzulänglichkeiten trägt die EAE seit langem zum besseren Verständnis der Pathogenese der MS bei. Studien an Tiermodellen haben direkt zur Entwicklung von drei weltweit verbreiteten Medikamenten gegen MS (Glatirameracetat, Mitoxantron und Natalizumab) geführt (Steinman and Zamvil, 2006) und die Experimente mit EAE-Modellen enthüllen ständig neue potenzielle Zielstrukturen zukünftiger MS-Therapien.

Die Generierung weiterer EAE-Modelle und die Kombination bestehender Modelle sowie die Testung bereits bekannter und neu entwickelter Substanzen an verschiedenen EAE-Typen wird auch in Zukunft effektive Therapiemöglichkeiten eröffnen.

5.9 Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen

Das Hauptziel der Therapie von Autoimmunkrankheiten besteht in einem gezielten Eingriff, um die Toleranz gegenüber den betreffenden Autoantigenen wieder herzustellen. Selektive, antigen-spezifische Immuntherapien sind besonders attraktiv, da sie – zumindest theoretisch – maximale Effizienz und minimale Nebenwirkungen miteinander vereinen.

Geht man davon aus, dass CD8⁺ T-Zellen eine vorwiegend pathogene Rolle bei der Multiplen Sklerose spielen, wäre es prinzipiell denkbar, die Ergebnisse dieser Arbeit auf den Menschen zu übertragen.

Man müsste Antikörper generieren, die ähnlich wie 25-D1.16 eine hohe Sensitivität und Spezifität für ein ZNS-Autoantigen, gebunden an ein MHC-I-Molekül, aufweisen. Mögliche Autoantigene wären beispielsweise Peptid-Derivate der Myelinkomponenten MBP, MAG oder PLP. Sollten diese Antikörper, wie in der vorliegenden Arbeit, mit dem antigenspezifischen TCR konkurrieren können, könnte die Aktivierung der autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen verhindert werden. Der besondere Reiz besteht in der Tatsache, dass die Antikörper selektiv pathologische Prozesse inhibieren würden, ohne andere T-Zell Antworten gegen das gleiche MHC-I-Molekül in Verbindung mit einem anderen Peptid zu beeinflussen, wie es bei anti-MHC-I Antikörpern der Fall ist.

Um eine Reaktion des Komplementsystems aufgrund Opsonisierung und die anschließende Zerstörung der mit Antikörpern markierten Zellen durch den Membranangriffskomplex C5b-9 zu verhindern, müsste ein Antikörper-Isotyp entwickelt werden, der die Komplementkaskade nicht aktiviert.

Der monoklonale Antikörper müsste außerdem die Fähigkeit besitzen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was jedoch je nach Grad der Schrankenstörung im Rahmen der Entzündung prinzipiell möglich wäre (Stuve et al., 2005).

Voraussetzung für eine antigen-spezifische Blockade der CD8⁺ T-Zell Aktivierung bei MS ist jedoch die Kenntnis der immundominanten Epitope im ZNS. Studien an EAE-Modellen und am Menschen deuten darauf hin, dass es eine große Anzahl möglicher ZNS-Autoantigene gibt. Die meisten der potenziell antigenen Epitope wurden mittels Prognose-Algorithmen bestimmt (Friese and Fugger, 2005). Die tatsächliche Erkennung durch autoreaktive CD8⁺ T-Zellen muss in vivo noch bestätigt werden.

Die meisten Studien konzentrierten sich bis jetzt auf Peptide, die mittels HLA-A2 präsentiert werden, hauptsächlich aufgrund des häufigen Vorkommens dieses MHC-I-Allels beim Menschen. Obwohl HLA-A2 einen protektiven Effekt zu haben scheint, waren viele der HLA-A2 restringierten CD8⁺ T-Zellantworten zytotoxischer Natur.

CD8⁺ T-Zellantworten auf die vorhergesagten Epitope von MBP, PLP und MAG wurden in MS-Patienten untersucht. Zytotoxische T-Zell Linien wurden isoliert; sie reagierten mit verschiedenen MBP-, PLP- und MAG-Peptiden (Tsuchida et al., 1994) und mit einem Transaldolase-Peptid (Niland et al., 2005). In den Studien wurde gezeigt, dass ZNS-Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen leichter zu expandieren waren, wenn sie von MS-Patienten stammten, als von gesunden Kontrollpersonen. Auch Mischungen von ZNS-Peptiden wurden von CD8⁺ T-Zellen aus MS-Patienten schneller erkannt (Crawford et al., 2004).

Ein weiteres Hindernis für die Identifizierung von Zielantigenen bei MS ist die dynamische Entwicklung dieser Autoimmunerkrankung. Bei Nagetieren kann sich die Immunantwort auf weitere Antigene ausdehnen (Lehmann et al., 1993). Tritt solch ein „epitope spreading“ auch beim Menschen auf, erhöht es die Schwierigkeit, das auslösende Antigen zu identifizieren, immens.

Selbst wenn mögliche antigene Epitope eindeutig identifiziert wären, bleibt dennoch das Problem der menschlichen Interindividualität. Patienten mit Multipler Sklerose besitzen viele verschiedene T-Zell-Klone mit unterschiedlicher Antigen-Spezifität.

Mithilfe von Tetramer Technologie konnten klonal expandierte CD8⁺ T-Zellen im Hinblick auf ihre Spezifität und Affinität charakterisiert werden (Jurewicz et al., 1998; Niland et al., 2005; Tsuchida et al., 1994). Noch fehlt aber eine effektive Screening-Methode, um die Epitope zu bestimmen, die von den autoreaktiven T-Zellen jedes einzelnen MS-Patienten erkannt werden. Die Entwicklung einer solchen Methode ist eine Voraussetzung für die effektive antigen-spezifische Immuntherapie.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass sich das von uns verwendete Modell der MS mit einer spezifischen Antikörper-Therapie erfolgreich therapieren lässt. Die Strategie, der MS mit gezielter Interferenz der Autoantigenerkennung zu begegnen, erwies sich als vielversprechend. Im Tiermodell konnte so eine drastische Senkung der Letalität erzielt werden.

Es bleibt nun zu hoffen, dass ähnliche Therapiestrategien in einigen Jahren auch im Menschen erfolgreich angewendet werden können. In jedem Fall motivieren die Ergebnisse dieser Arbeit zu weiterer Forschung auf diesem Gebiet.

6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine schwere, momentan noch unheilbare Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems, die weltweit ca. 1 Mio. Menschen betrifft. Da die zur Zeit verfügbaren, anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Therapieformen lediglich krankheitsverzögernd wirken, ist es Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen, Möglichkeiten zur spezifischen Interferenz mit bei der MS ablaufenden Pathomechanismen zu ergründen und im Tiermodell zu testen.

Das von uns für diese Arbeit verwendete Mausmodell einer CD8⁺ T-Zell vermittelten Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) trägt dabei neuen Erkenntnissen Rechnung, die zeigen, dass zytotoxische T-Lymphozyten bei der Pathogenese der humanen MS von entscheidender Bedeutung sind. Es handelt sich um doppelt transgene Nachkommen von Mäusen, die das Modell-Antigen Ovalbumin (OVA) unter der Kontrolle eines Oligodendrozyten (ODC-)-spezifischen MBP-Promotors im ZNS exprimieren, und Mäusen, die Ovalbumin-spezifische CD8⁺ T-Zellen besitzen (OT-I Zellen). Es kommt in diesem Modell zur Autoantigenerkennung durch die CD8⁺ T-Zellen mit konsekutiver Ausbildung einer fulminanten, letal verlaufenden EAE.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die therapeutische Potenz des monoklonalen Antikörpers 25-D1.16 zu evaluieren, der gegen das Autoantigen Ovalbumin in Kombination mit einem MHC-I-Molekül gerichtet ist.

Mit Hilfe von FACS-Analysen und Fluoreszenz-Mikroskopie konnten wir zunächst bestätigen, dass 25-D1.16 spezifisch den Komplex aus dem Peptid SIINFEKL (antigenes Epitop von Ovalbumin) gebunden an ein MHC-I-Molekül (H-2K^b) erkennt.

In nachfolgenden in vitro Versuchen wurde der Einfluss des Antikörpers auf Aktivierung und Proliferation von durch SIINFEKL:MHC-I-Komplex stimulierten OT-I Zellen untersucht. Es wurden hierfür Zellproliferation (Proliferations-Assays), Expression des Oberflächenmoleküls CD69 (FACS-Analysen) sowie IFN- γ -Sekretion (ELISA) gemessen. In Gegenwart von 25-D1.16 zeigte sich durchweg eine hochsignifikante Reduktion der jeweiligen Proliferations-/Aktivierungsmarker. Wir konnten somit in vitro zeigen, dass der gegen das Autoantigen Ovalbumin/H-2K^b gerichtete, monoklonale Antikörper 25-D1.16 kompetitiv die Aktivierung und Proliferation entsprechender T-Lymphozyten inhibieren kann.

Um diese Daten in vivo zu validieren und die pathogenetische Relevanz zu überprüfen, haben wir ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Mäusen verschiedene Dosen von 25-D1.16 vor Auftreten erster EAE-Symptome einmalig intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurde der Krankheitsverlauf klinisch beurteilt. Im EAE-Stadium 4 ohne Besserungstendenz oder bei Versuchsende wurden außerdem histologische Schnitte des Zentralnervensystems angefertigt, gefärbt (H.E., CD3, Mac-3, Luxol Fast Blue/PAS) und mit unbehandelten Tieren verglichen.

Ein Teil der ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Tiere blieb nach Applikation des Antikörpers völlig gesund, während bei einem anderen Teil der Ausbruch der EAE zwar nicht vollständig verhindert, ihr Schweregrad aber deutlich gemildert wurde.

Der Effekt der Antikörpertherapie war jedoch nicht nur klinisch, sondern auch histopathologisch überzeugend. So zeigte das Zentralnervensystem erfolgreicher therapierter Mäuse eine weitgehend bis vollständig intakte Gewebsarchitektur (H.E.-Färbung) mit im Vergleich zu unbehandelten Mäusen drastisch reduzierter OT-I Zell- und Makrophagen/Mikroglia-Infiltration (Immunhistochemie CD3 und Mac-3). In der Luxol Fast Blue/PAS-Färbung fanden sich keinerlei Entmarkungsherde sondern durchgängig myelinisierte Axone.

Es gelang uns somit durch hohe Antikörperdosen (500 µg pro ODC-OVA/OT-I doppelt transgener Maus) bei 83 % der behandelten Versuchstiere den Ausbruch der EAE ganz zu verhindern bzw. deren Verlauf deutlich abzumildern.

Zusammenfassend beschreiben wir hier erstmals die antigen-spezifische Therapie einer CD8⁺ T-Zell medierten EAE mittels eines gegen Peptid:MHC-I-Komplex gerichteten, monoklonalen Antikörpers. Durch Interferenz mit der Erkennung des Autoantigens durch die CD8⁺ T-Zellen waren wir in vivo in der Lage, den Pathomechanismus der EAE zu inhibieren. Hieraus ergibt sich ein vielversprechendes Behandlungskonzept für die Therapie der Multiplen Sklerose am Menschen.

7 Literaturverzeichnis

- Aboul-Enein, F., Bauer, J., Klein, M., Schubart, A., Flugel, A., Ritter, T., Kawakami, N., Siedler, F., Linington, C., Wekerle, H., *et al.* (2004). Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 1284-1296.
- Aboul-Enein, F., Rauschka, H., Kornek, B., Stadelmann, C., Stefferl, A., Bruck, W., Lucchinetti, C., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2003). Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 25-33.
- Agresti, C., Bernardo, A., Del Russo, N., Marziali, G., Battistini, A., Aloisi, F., Levi, G., and Coccia, E. M. (1998). Synergistic stimulation of MHC class I and IRF-1 gene expression by IFN-gamma and TNF-alpha in oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 10, 2975-2983.
- Aharoni, R., Teitelbaum, D., Arnon, R., and Puri, J. (1991). Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies to the antigen-Ia complex. *Nature* 351, 147-150.
- Alam, S. M., Travers, P. J., Wung, J. L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S. C., and Gascoigne, N. R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-620.
- Alzari, P. M., Lascombe, M. B., and Poljak, R. J. (1988). Three-dimensional structure of antibodies. *Annu Rev Immunol* 6, 555-580.
- Antel, J. P., and Bar-Or, A. (2003). Do myelin-directed antibodies predict multiple sclerosis? *N Engl J Med* 349, 107-109.
- Archelos, J. J., and Hartung, H. P. (2000). Pathogenetic role of autoantibodies in neurological diseases. *Trends Neurosci* 23, 317-327.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmidt, S., *et al.* (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192, 393-404.
- Beck, R. W., Cleary, P. A., Anderson, M. M., Jr., Keltner, J. L., Shults, W. T., Kaufman, D. I., Buckley, E. G., Corbett, J. J., Kupersmith, M. J., Miller, N. R., and *et al.* (1992). A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med* 326, 581-588.
- Benoist, C., and Mathis, D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2, 797-801.
- Biegler, B. W., Yan, S. X., Ortega, S. B., Tennakoon, D. K., Racke, M. K., and Karandikar, N. J. (2006). Glatiramer acetate (GA) therapy induces a focused, oligoclonal CD8+ T-cell repertoire in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 180, 159-171.
- Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J. A., *et al.* (2000). Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6, 1167-1175.
- Bielekova, B., Richert, N., Howard, T., Blevins, G., Markovic-Plese, S., McCartin, J., Frank, J. A., Wurfel, J., Ohayon, J., Waldmann, T. A., *et al.* (2004). Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8705-8708.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., and Bruck, W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 (Pt 6), 1174-1183.
- Bongrand, P., and Malissen, B. (1998). Quantitative aspects of T-cell recognition: from within the antigen-presenting cell to within the T cell. *Bioessays* 20, 412-422.
- Booss, J., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W., and Mason, D. Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 62, 219-232.
- Cao, Y., Toben, C., Na, S. Y., Stark, K., Nitschke, L., Peterson, A., Gold, R., Schimpl, A., and Hunig, T. (2006). Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in transgenic mice expressing ovalbumin in oligodendrocytes. *Eur J Immunol* 36, 207-215.
- Cepok, S., Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Stei, S., Bussow, K., Sommer, N., and Hemmer, B. (2005). Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115, 1352-1360.
- Chen, W., McCluskey, J., Rodda, S., and Carbone, F. R. (1993). Changes at peptide residues buried in the major histocompatibility complex (MHC) class I binding cleft influence T cell recognition: a possible role for indirect conformational alterations in the MHC class I or bound peptide in determining T cell recognition. *J Exp Med* 177, 869-873.
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A., and Strominger, J. L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358, 764-768.
- Christinck, E. R., Luscher, M. A., Barber, B. H., and Williams, D. B. (1991). Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 352, 67-70.
- Cleland, J. G., Daubert, J. C., Erdmann, E., Freemantle, N., Gras, D., Kappenberger, L., and Tavazzi, L. (2005). The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 352, 1539-1549.
- Crawford, M. P., Yan, S. X., Ortega, S. B., Mehta, R. S., Hewitt, R. E., Price, D. A., Stastny, P., Douek, D. C., Koup, R. A., Racke, M. K., and Karandikar, N. J. (2004). High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103, 4222-4231.
- Cree, B. A., Lamb, S., Morgan, K., Chen, A., Waubant, E., and Genain, C. (2005). An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. *Neurology* 64, 1270-1272.
- Davies, D. R., and Metzger, H. (1983). Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* 1, 87-117.
- Davis, M. M., Boniface, J. J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-544.

- De Magistris, M. T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F. C., Grey, H. M., and Sette, A. (1992). Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* **68**, 625-634.
- DeLorenze, G. N., Munger, K. L., Lennette, E. T., Orentreich, N., Vogelman, J. H., and Ascherio, A. (2006). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol* **63**, 839-844.
- Demotz, S., Grey, H. M., and Sette, A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* **249**, 1028-1030.
- Dhib-Jalbut, S. (2003). Glatiramer acetate (Copaxone) therapy for multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* **98**, 245-255.
- Dyall, R., Fremont, D. H., Jameson, S. C., and Nikolic-Zugic, J. (1996). T cell receptor (TCR) recognition of MHC class I variants: intermolecular second-site reversion provides evidence for peptide/MHC conformational variation. *J Exp Med* **184**, 253-258.
- Engelhardt, B., and Ransohoff, R. M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol* **26**, 485-495.
- Farhadi, H. F., Lepage, P., Forghani, R., Friedman, H. C., Orfali, W., Jasmin, L., Miller, W., Hudson, T. J., and Peterson, A. C. (2003). A combinatorial network of evolutionarily conserved myelin basic protein regulatory sequences confers distinct glial-specific phenotypes. *J Neurosci* **23**, 10214-10223.
- Faunce, D. E., Terajewicz, A., and Stein-Streilein, J. (2004). Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **172**, 1991-1995.
- Filaci, G., Bacilieri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., and Indiveri, F. (2001). Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **166**, 6452-6457.
- Fogdell-Hahn, A., Ligiers, A., Gronning, M., Hillert, J., and Olerup, O. (2000). Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* **55**, 140-148.
- Ford, M. L., and Evavold, B. D. (2005). Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8+ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **35**, 76-85.
- Friese, M. A., and Fugger, L. (2005). Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* **128**, 1747-1763.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134-141.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., and Wilson, I. A. (1996). An alpha beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**, 209-219.
- Geppert, T. D., Wacholtz, M. C., Patel, S. S., Lightfoot, E., and Lipsky, P. E. (1989). Activation of human T cell clones and Jurkat cells by cross-linking class I MHC molecules. *J Immunol* **142**, 3763-3772.
- Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-299.
- Germain, R. N., and Stefanova, I. (1999). The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* **17**, 467-522.
- Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **195**, 695-704.
- Gobel, K., Melzer, N., Herrmann, A. M., Schuhmann, M. K., Bittner, S., Ip, C. W., Hunig, T., Meuth, S. G., and Wiendl, H. (2009). Collateral neuronal apoptosis in CNS gray matter during an oligodendrocyte-directed CD8(+) T cell attack. *Glia*.
- Gobin, S. J., Montagne, L., Van Zutphen, M., Van Der Valk, P., Van Den Elsen, P. J., and De Groot, C. J. (2001). Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* **36**, 68-77.
- Gold, R., Linington, C., and Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953-1971.
- Goodin, D. S., Frohman, E. M., Garmany, G. P., Jr., Halper, J., Likosky, W. H., Lublin, F. D., Silberberg, D. H., Stuart, W. H., and van den Noort, S. (2002). Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* **58**, 169-178.
- Grauer, O., Offenhausser, M., Schmidt, J., Toyka, K. V., and Gold, R. (2001). [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* **72**, 577-589.
- Haines, J. L., Ter-Minassian, M., Bazyk, A., Gusella, J. F., Kim, D. J., Terwedow, H., Pericak-Vance, M. A., Rimmler, J. B., Haynes, C. S., Roses, A. D., *et al.* (1996). A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* **13**, 469-471.
- Harbo, H. F., Lie, B. A., Sawcer, S., Celius, E. G., Dai, K. Z., Otrai, A., Hillert, J., Lorentzen, A. R., Laaksonen, M., Myhr, K. M., *et al.* (2004). Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* **63**, 237-247.
- Harding, C. V., and Unanue, E. R. (1990). Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* **346**, 574-576.
- Hartung, H. P., Gonsette, R., Konig, N., Kwiecinski, H., Guseo, A., Morrissey, S. P., Krapf, H., and Zvingers, T. (2002). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* **360**, 2018-2025.
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., *et al.* (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* **358**, 676-688.
- Hayashi, T., Morimoto, C., Burks, J. S., Kerr, C., and Hauser, S. L. (1988). Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol* **24**, 523-531.
- Hein, T., and Hopfenmuller, W. (2000). [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* **71**, 288-294.

- Hoffberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2004). Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14, 43-50.
- Hogquist, K. A., Gavin, M. A., and Bevan, M. J. (1993). Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 177, 1469-1473.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Huard, R., Dyal, R., and Nikolic-Zugic, J. (1997). The critical role of a solvent-exposed residue of an MHC class I-restricted peptide in MHC-peptide binding. *Int Immunol* 9, 1701-1707.
- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., and Engelhard, V. H. (1992). Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255, 1261-1263.
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C., and Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194, 669-676.
- Huseby, E. S., Ohlen, C., and Goverman, J. (1999). Cutting edge: myelin basic protein-specific cytotoxic T cell tolerance is maintained in vivo by a single dominant epitope in H-2k mice. *J Immunol* 163, 1115-1118.
- Jameson, S. C., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1993). Clone-specific T cell receptor antagonists of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T cells. *J Exp Med* 177, 1541-1550.
- Jiang, H., Zhang, S. I., and Pernis, B. (1992). Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256, 1213-1215.
- Johnson, A. J., Suidan, G. L., McDole, J., and Pirko, I. (2007). The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? *Int Rev Neurobiol* 79, 73-97.
- Jones, J. L., and Coles, A. J. (2008). Campath-1H treatment of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 5, 27-31.
- Jurewicz, A., Biddison, W. E., and Antel, J. P. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 160, 3056-3059.
- Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C. H., Haas, T., Korn, A. A., Karlsson, G., and Radue, E. W. (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355, 1124-1140.
- Kappos, L., Comi, G., Panitch, H., Oger, J., Antel, J., Conlon, P., and Steinman, L. (2000). Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. The Altered Peptide Ligand in Relapsing MS Study Group. *Nat Med* 6, 1176-1182.
- Karandikar, N. J., Crawford, M. P., Yan, X., Ratts, R. B., Brenchley, J. M., Ambrozak, D. R., Lovett-Racke, A. E., Frohman, E. M., Stastny, P., Douek, D. C., *et al.* (2002). Glatiramer acetate (Copaxone) therapy induces CD8(+) T cell responses in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 109, 641-649.
- Kaufman, D. I., Trobe, J. D., Eggenberger, E. R., and Whitaker, J. N. (2000). Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 54, 2039-2044.
- Kleinschnitz, C., Meuth, S. G., Kieseier, B. C., and Wiendl, H. (2007). [Update on pathophysiologic and immunotherapeutic approaches for the treatment of multiple sclerosis]. *Nervenarzt* 78, 883-911.
- Kobelt, G., Berg, J., Lindgren, P., Elias, W. G., Flachenecker, P., Freidel, M., Konig, N., Limmroth, V., and Straube, E. (2006). Costs and quality of life of multiple sclerosis in Germany. *Eur J Health Econ* 7 Suppl 2, S34-44.
- Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., and Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.
- Kumar, V. (2004). Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. *J Clin Invest* 114, 1222-1226.
- Lassmann, H., Bruck, W., and Lucchinetti, C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115-121.
- Lehmann, P. V., Sercarz, E. E., Forsthuber, T., Dayan, C. M., and Gammon, G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol Today* 14, 203-208.
- Lim, E. T., Berger, T., Reindl, M., Dalton, C. M., Fernando, K., Keir, G., Thompson, E. J., Miller, D. H., and Giovannoni, G. (2005). Anti-myelin antibodies do not allow earlier diagnosis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 11, 492-494.
- Linker, R. A., Rott, E., Hofstetter, H. H., Hanke, T., Toyka, K. V., and Gold, R. (2005). EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol Dis* 19, 218-228.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717.
- MacCallum, R. M., Martin, A. C., and Thornton, J. M. (1996). Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262, 732-745.
- Madakamutil, L. T., Maricic, I., Sercarz, E., and Kumar, V. (2003). Regulatory T cells control autoimmunity in vivo by inducing apoptotic depletion of activated pathogenic lymphocytes. *J Immunol* 170, 2985-2992.
- Malarkannan, S., Afkarian, M., and Shastri, N. (1995). A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells. *J Exp Med* 182, 1739-1750.
- Mareeva, T., Lebedeva, T., Anikeeva, N., Manser, T., and Sykulev, Y. (2004). Antibody specific for the peptide-major histocompatibility complex. Is it T cell receptor-like? *J Biol Chem* 279, 44243-44249.
- Martin, R. (2008). Humanized anti-CD25 antibody treatment with daclizumab in multiple sclerosis. *Neurodegener Dis* 5, 23-26.
- Matiello, M., Jacob, A., Wingerchuk, D. M., and Weinshenker, B. G. (2007). Neuromyelitis optica. *Curr Opin Neurol* 20, 255-260.
- Mazza, G., Housset, D., Piras, C., Gregoire, C., Lin, S. Y., Fontecilla-Camps, J. C., and Malissen, B. (1998). Glimpses at the recognition of peptide/MHC complexes by T-cell antigen receptors. *Immunol Rev* 163, 187-196.

- McDole, J., Johnson, A. J., and Pirko, I. (2006). The role of CD8+ T-cells in lesion formation and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Neurol Res* 28, 256-261.
- McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., *et al.* (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127.
- Medana, I., Martinic, M. A., Wekerle, H., and Neumann, H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 159, 809-815.
- Messaoudi, I., LeMaout, J., and Nikolic-Zugic, J. (1999). The mode of ligand recognition by two peptide:MHC class I-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 163, 3286-3294.
- Mian, I. S., Bradwell, A. R., and Olson, A. J. (1991). Structure, function and properties of antibody binding sites. *J Mol Biol* 217, 133-151.
- Monteiro, J., Hingorani, R., Pergolizzi, R., Apatoff, B., and Gregersen, P. K. (1995). Clonal dominance of CD8+ T-cell in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 756, 310-312.
- Montero, E., Nussbaum, G., Kaye, J. F., Perez, R., Lage, A., Ben-Nun, A., and Cohen, I. R. (2004). Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies. *J Autoimmun* 23, 1-7.
- Moore, M. W., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.
- Munz, C., Steinman, R. M., and Fujii, S. (2005). Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 202, 203-207.
- Murphy, D. B., Rath, S., Pizzo, E., Rudensky, A. Y., George, A., Larson, J. K., and Janeway, C. A., Jr. (1992). Monoclonal antibody detection of a major self peptide. MHC class II complex. *J Immunol* 148, 3483-3491.
- Na, S. Y., Cao, Y., Toben, C., Nitschke, L., Stadelmann, C., Gold, R., Schimpl, A., and Hunig, T. (2008). Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain* 131, 2353-2365.
- Na, S. Y., Eujen, H., Gobel, K., Meuth, S. G., Martens, K., Wiendl, H., and Hunig, T. (2009). Antigen-specific blockade of lethal CD8 T-cell mediated autoimmunity in a mouse model of multiple sclerosis. *J Immunol* 182, 6569-6575.
- Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A. D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M. R., Sayegh, M. H., and Khoury, S. J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112, 1037-1048.
- Neumann, H., Cavalié, A., Jenne, D. E., and Wekerle, H. (1995). Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269, 549-552.
- Neumann, H., Medana, I. M., Bauer, J., and Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25, 313-319.
- Nikolic-Zugic, J., and Bevan, M. J. (1990). Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* 344, 65-67.
- Niland, B., Banki, K., Biddison, W. E., and Perl, A. (2005). CD8+ T cell-mediated HLA-A*0201-restricted cytotoxicity to transaldolase peptide 168-176 in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 175, 8365-8378.
- Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B. G. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343, 938-952.
- O'Connor, P. W., Li, D., Freedman, M. S., Bar-Or, A., Rice, G. P., Confavreux, C., Paty, D. W., Stewart, J. A., and Scheyer, R. (2006). A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. *Neurology* 66, 894-900.
- Odeberg, J., Piao, J. H., Samuelsson, E. B., Falci, S., and Akesson, E. (2005). Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol* 161, 1-11.
- Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C., and *et al.* (1993). Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68-70.
- Olerup, O., and Hillert, J. (1991). HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1-15.
- Oliveri, R. L., Valentino, P., Russo, C., Sibilia, G., Aguglia, U., Bono, F., Fera, F., Gambardella, A., Zappia, M., Pardatscher, K., and Quattrone, A. (1998). Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 50, 1833-1836.
- Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* 23, 4727-4737.
- Patani, R., Balaratnam, M., Vora, A., and Reynolds, R. (2007). Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 277-287.
- Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S., Bruck, W., Lucchinetti, C., and Lassmann, H. (2006). Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-3172.
- Perchellet, A., Stromnes, I., Pang, J. M., and Goverman, J. (2004). CD8+ T cells maintain tolerance to myelin basic protein by 'epitope theft'. *Nat Immunol* 5, 606-614.
- Peterson, J. W., Bo, L., Mork, S., Chang, A., and Trapp, B. D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400.
- Polman, C., Barkhof, F., Sandberg-Wollheim, M., Linde, A., Nordle, O., and Nederman, T. (2005). Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology* 64, 987-991.
- Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Waigjt, A., *et al.* (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.

- Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R., and Germain, R. N. (1997). Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6, 715-726.
- Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C. J., *et al.* (2006). Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116, 456-464.
- Ransohoff, R. M., and Estes, M. L. (1991). Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy. *Arch Neurol* 48, 1244-1246.
- Rieckmann, P., and Maurer, M. (2002). Anti-inflammatory strategies to prevent axonal injury in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 15, 361-370.
- Romine, J. S., Sipe, J. C., Koziol, J. A., Zyroff, J., and Beutler, E. (1999). A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of cladribine in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Proc Assoc Am Physicians* 111, 35-44.
- Rose, J. W., Burns, J. B., Bjorklund, J., Klein, J., Watt, H. E., and Carlson, N. G. (2007). Daclizumab phase II trial in relapsing and remitting multiple sclerosis: MRI and clinical results. *Neurology* 69, 785-789.
- Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H. G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21, 2891-2894.
- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A., Jr. (1991a). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627.
- Rudensky, A., Rath, S., Preston-Hurlburt, P., Murphy, D. B., and Janeway, C. A., Jr. (1991b). On the complexity of self. *Nature* 353, 660-662.
- Ruhwald, M., Pedersen, A. E., and Claesson, M. H. (1999). MHC class I cross-talk with CD2 and CD28 induces specific intracellular signalling and leads to growth retardation and apoptosis via a p56(lck)-dependent mechanism. *Exp Clin Immunogenet* 16, 199-211.
- Ruijs, T. C., Freedman, M. S., Grenier, Y. G., Olivier, A., and Antel, J. P. (1990). Human oligodendrocytes are susceptible to cytotoxicity by major histocompatibility complex class I-restricted lymphocytes. *J Neuroimmunol* 27, 89-97.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352.
- Schimrigk, S., Brune, N., Hellwig, K., Lukas, C., Bellenberg, B., Rieks, M., Hoffmann, V., Pohlau, D., and Przuntek, H. (2006). Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study. *Eur J Neurol* 13, 604-610.
- Schumacher, T. N., Heemels, M. T., Neeffjes, J. J., Kast, W. M., Melief, C. J., and Ploegh, H. L. (1990). Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 62, 563-567.
- Schwarz, K., Hansen-Hagge, T. E., and Bartram, C. R. (1993). Recombinase deficiency in mouse and man. *Immunodeficiency* 4, 249-252.
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2428-2433.
- Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. D., and Allen, P. M. (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363, 156-159.
- Smilek, D. E., Wraith, D. C., Hodgkinson, S., Dwivedy, S., Steinman, L., and McDevitt, H. O. (1991). A single amino acid change in a myelin basic protein peptide confers the capacity to prevent rather than induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9633-9637.
- Sorensen, P. S., Ross, C., Clemmesen, K. M., Bendtzen, K., Frederiksen, J. L., Jensen, K., Kristensen, O., Petersen, T., Rasmussen, S., Ravnborg, M., *et al.* (2003). Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362, 1184-1191.
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
- Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol* 2, 762-764.
- Steinman, L. (2005). Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4, 510-518.
- Steinman, L., and Zamvil, S. S. (2006). How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60, 12-21.
- Stuve, O., Cepok, S., Elias, B., Saleh, A., Hartung, H. P., Hemmer, B., and Kieseier, B. C. (2005). Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arch Neurol* 62, 1620-1623.
- Sun, D., Qin, Y., Chluba, J., Epplen, J. T., and Wekerle, H. (1988). Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* 332, 843-845.
- Sun, D., Whitaker, J. N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., and Raine, C. S. (2001). Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166, 7579-7587.
- Sun, D., Zhang, Y., Wei, B., Peiper, S. C., Shao, H., and Kaplan, H. J. (2003). Encephalitogenic activity of truncated myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptides and their recognition by CD8+ MOG-specific T cells on oligomeric MHC class I molecules. *Int Immunol* 15, 261-268.
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* 4, 565-571.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., and Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 15, 479-483.

- Thompson, A. J., Montalban, X., Barkhof, F., Brochet, B., Filippi, M., Miller, D. H., Polman, C. H., Stevenson, V. L., and McDonald, W. I. (2000). Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol* 47, 831-835.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggren, H. G., Foster, L., and Karre, K. (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Tsuchida, T., Parker, K. C., Turner, R. V., McFarland, H. F., Coligan, J. E., and Biddison, W. E. (1994). Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10859-10863.
- Turco, M. C., de Felice, M., Corbo, L., Giarrusso, P. C., Yang, S. Y., Ferrone, S., and Venuta, S. (1988). Enhancing effect of anti-HLA class I monoclonal antibodies on T cell proliferation induced via CD2 molecule. *J Immunol* 141, 2275-2281.
- van Oosten, B. W., Lai, M., Hodgkinson, S., Barkhof, F., Miller, D. H., Moseley, I. F., Thompson, A. J., Rudge, P., McDougall, A., McLeod, J. G., *et al.* (1997). Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351-357.
- Viret, C., and Janeway, C. A., Jr. (2000). Functional and phenotypic evidence for presentation of E alpha 52-68 structurally related self-peptide(s) in I-E alpha-deficient mice. *J Immunol* 164, 4627-4634.
- Weinshenker, B. G. (1998). The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 18, 301-307.
- Weinshenker, B. G., and Ebers, G. C. (1987). The natural history of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 14, 255-261.
- Weinshenker, B. G., O'Brien, P. C., Petterson, T. M., Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C. F., Dodick, D. W., Pineda, A. A., Stevens, L. N., and Rodriguez, M. (1999). A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Ann Neurol* 46, 878-886.
- Weiss, H. A., Millward, J. M., and Owens, T. (2007). CD8+ T cells in inflammatory demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 191, 79-85.
- Wilson, I. A., and Stanfield, R. L. (1994). Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 4, 857-867.
- Yarke, C. A., Dalheimer, S. L., Zhang, N., Catron, D. M., Jenkins, M. K., and Mueller, D. L. (2008). Proliferating CD4+ T cells undergo immediate growth arrest upon cessation of TCR signaling in vivo. *J Immunol* 180, 156-162.
- Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (1990). The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 62, 203-206.
- Zamvil, S. S., and Steinman, L. (2003). Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38, 685-688.
- Zang, Y. C., Li, S., Rivera, V. M., Hong, J., Robinson, R. R., Breitbart, W. T., Killian, J., and Zhang, J. Z. (2004). Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 172, 5120-5127.
- Zipp, F., Martin, R., Lichtenfels, R., Roth, W., Dichgans, J., Krammer, P. H., and Weller, M. (1997). Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand. *J Immunol* 159, 2108-2115.

Lehrbücher

Poeck, K. und Hacke, W., *Neurologie* (ISBN 3-540-29997-1) © 2006 Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

H.C. Diener u.a., *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie* (ISBN 3-13-132413-9) © 2005 Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

8 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung

1.1	Überblick über die an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligten Elemente des Immunsystems	4
1.2	Immunmodulatorische Stufentherapie der MS	7
1.3	Konstrukt des Transgens der ODC-OVA Mäuse und Lokalisation der Primer für die OVA-Genotypisierungs-PCR	10
1.4	ODC-OVA/OT-I Mäuse in fortgeschrittenem Krankheitsstadium	11
1.5	Vorausgesagte Bindungsstelle von 25-D1.16 an ein MHC-I-Protein	16
1.6	Schematische Darstellung der Hypothese der Experimente dieser Arbeit	18
4.1	Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE von 25-D1.16 und D665	50
4.2	25-D1.16 detektiert OVA-8:H-2K ^b Komplexe auf der Oberfläche von mit SIINFEKL inkubierten EL4 Zellen (FACS-Analyse)	51
4.3	Mit steigender Verdünnung von 25-D1.16 nimmt die Anzahl der durch den Antikörper markierten OVA-8:H-2K ^b Komplexe ab	52
4.4	Erkennung von OVA-8:MHC-I Komplexen auf mit SIINFEKL inkubierten EL4 Zellen durch 25-D1.16 (fluoreszenzmikroskopische Analyse)	53
4.5	Reinheitsgrad der aus Lymphknoten von OT-I transgenen BL/6 Mäusen immunmagnetisch separierten CD8 ⁺ Zellen	55
4.6	Oberflächenfärbungen des Aktivierungsmarkers CD69 auf OT-I Zellen, die durch SIINFEKL stimuliert wurden	56
4.7	Proliferation von OT-I Zellen in Anwesenheit von SIINFEKL und 25-D1.16	57
4.8	Interferon- γ -Produktion durch OT-I Zellen in Gegenwart von SIINFEKL und 25-D1.16	59
4.9.a	Oberflächenfärbung von EG.7-OVA Zellen	61
4.9.b	Titration des Antikörpers 25-D1.16 in einer FACS-Färbung	61
4.10	25-D1.16 verhindert die Hochregulation von CD69 durch OT-I Zellen nach SIINFEKL-Stimulation	63
4.11	Proliferation von OT-I Zellen in Anwesenheit von EG.7-OVA und 25-D1.16 im Zeitverlauf	64
4.12	Zytokinproduktion von OT-I Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von 25-D1.16 ermittelt per ELISA	66
4.13	Phänotypisierung der Mäuse mittels FACS-Färbung	69
4.14	OVA-Genotypisierungs-PCR aus lysierten Schwänzen der mit 25-D1.16 behandelten Mäuse	70

4.15	Histopathologie einer OT-I transgenen und einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Maus, ohne Antikörper-Therapie	71
4.16	EAE-Krankheitsverlauf bei ODC-OVA/OT-I Mäusen nach Behandlung mit 25-D1.16	73
4.17	Wachstumskurven der mit 500 μg 25-D1.16 behandelten doppelt transgenen Tiere	75
4.18	EAE-Läsionen im ZNS einer mit 100 μg 25-D1.16 behandelten ODC-OVA/OT-I Maus	76
4.19	Histopathologie einer ODC-OVA/OT-I doppelt transgenen Maus, der 200 μg 25-D1.16 injiziert wurden	77
4.20	Repräsentative Schnitte aus dem ZNS einer mit 500 μg 25-D1.16 immunisierten ODC-OVA/OT-I Maus	78
4.21	Vergleich der CD8 Zellzahlen von mit 200 und 500 μg 25-D1.16 behandelten und unbehandelten Tieren	80
4.22	500 μg 25-D1.16 reduzieren hochsignifikant Schweregrad der EAE und Letalität	81
5.1	Argumente für eine pathogene Rolle der CD8 ⁺ T-Zellen bei Multipler Sklerose	96

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=	Abbildung
ABC	=	Avidin-Biotin-Complex
Ak	=	Antikörper
APC	=	Antigen-präsentierende Zelle
APL	=	altered peptide ligand
BHS	=	Blut-Hirn-Schranke
BIO	=	biotinyliert
bp	=	basepair(s)
BSA	=	Bovines Serum Albumin
BSS	=	balanced salt solution
CD	=	cluster of differentiation
CDRs	=	complementary determining regions
CFA	=	complete Freund's adjuvant
CFSE	=	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
Ci	=	Curie
CO ₂	=	Kohlenstoffdioxid
cpm	=	counts per minute
DAB	=	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	=	Diamidinphenylindoldihydrochlorid
dd	=	destilliert
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	desoxy-ribo-nucleid acid
dNTP	=	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	=	Epstein-Barr-Virus
EAE	=	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
ED	=	Enzephalomyelitis disseminata
EDTA	=	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	=	fluorescence activated cell sorter
FCS	=	fetal calf serum
FITC	=	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	=	forward scatter
FTOC	=	fetal thymic organ culture
Gy	=	Gray
HE	=	Hämatoxylin-Eosin
HLA	=	Humanes Leukozyten Antigen
H ₂ O	=	Wasser
IFN	=	Interferon
Ig	=	Immunglobulin

IL	=	Interleukin
IVIg	=	intravenöse Immunglobuline
Kap.	=	Kapitel
LFB	=	Luxol Fast Blue
LPS	=	Lipopolysaccharid
LT	=	Lymphotoxin
MOBP	=	myelin-associated oligodendrocyte basic protein
MACS	=	magnetic cell sorting
MAG	=	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mAk	=	monoklonale Antikörper
MBP	=	basisches Myelinprotein
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
MHC	=	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	=	Minute
MMPs	=	Matrixmetalloproteasen
MOG	=	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	=	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	=	Multiple Sklerose
NAB	=	neutralisierende Antikörper
NaCl	=	Natriumchlorid
NO	=	Stickstoffmonoxid
ODC	=	Oligodendrozyt
OVA	=	Ovalbumin
PAS	=	Periodic acid-Schiff
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
PE	=	Phycoerythrin
PerCP	=	Peridinin Chlorophyll Protein
PLP	=	Proteolipoprotein
PML	=	progressive multifokale Leukenzephalopathie
rpm	=	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	=	Raumtemperatur
SIIN	=	SIINFEKL
SSC	=	sideward scatter
TCR	=	T-Zell Rezeptor
TGF	=	transforming growth factor
TNF	=	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	=	regulatorische T-Zelle
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM	=	vascular cell adhesion molecule
ZNS	=	Zentralnervensystem

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Shin-Young Na für die engagierte Betreuung dieses Projektes, die vielen wertvollen Ratschläge und die freundliche Arbeitsatmosphäre, sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hünig für die Vergabe dieses interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Virologie und Immunbiologie und seine stetige Unterstützung.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Hünig außerdem für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Immunmodulation“ der Universität Würzburg anfertigen zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hünig bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

In alphabetischer Reihenfolge waren dies: Dr. Karin Elflein, Beate Geyer, Dr. Tea Gogishvili, Dr. Shin-Young Na, Peter Zigan und Alexander Zant.

Vielen Dank den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen am Institut für Virologie und Immunbiologie für ihre Hilfestellung bei allen auftretenden Fragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Personen meines privaten Umfeldes für den immerwährenden Rückhalt und die Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken.

Dies sind meine Eltern Rosi und Enno Eujen, meine Schwestern Andrea und Ulrike Eujen und natürlich mein Freund Thomas Fischer.

Curriculum Vitae

Ausbildung

- seit 02/10 Tätigkeit als **Assistenzärztin** in der **Abteilung Pädiatrie II** des Universitätsklinikums der Georg-August-Universität Göttingen
- 04/03 – 11/09 **Studium der Humanmedizin** an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 08/08 – 07/09 **Praktisches Jahr**
- | | |
|----------------|---|
| Chirurgie | Hospital de Niños, Universidad de Buenos Aires, Argentinien (Kinderchirurgie) |
| Innere Medizin | Hôpital Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie, Paris, Frankreich (Hepato-Gastroenterologie)
University of Rochester Medical School, NY, USA (Kardiologie, Nephrologie) |
| Pädiatrie | Wahlfach (Universitäts-Kinderklinik Würzburg) |
- seit 03/06 Experimentelle Doktorarbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Immunmodulation“ im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg (Prof. Dr. Thomas Hünig)
Thema: **Blockade der Antigenerkennung als therapeutische Strategie in einem CD8⁺ T-Zell vermittelten Mausmodell der Multiplen Sklerose**
- 09/07 – 02/08 Studium der Humanmedizin an der Université Victor Segalen de Bordeaux, Bordeaux / Frankreich
- 06/02 Abitur am Gymnasium Roth – Bayern

Stipendien

- seit 06/03 Stipendiatin der “Bayerischen Begabtenförderung”
- seit 03/06 Stipendiatin der “Studienstiftung des deutschen Volkes”
- 09/07 & 08/08 Auslandsstipendien der Studienstiftung des deutschen Volkes im Rahmen des Auslandssemesters in Bordeaux und der Auslandsaufenthalte während des PJs

Publikationen

- Na SY, Eujen H, Toben C, Cao Y, Schimpl A, Gold R, Hünig T.
Spontaneous development of CD8-mediated EAE in a new transgenic mouse model.
Abstract, 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg 2007
- Na SY, Eujen H, Göbel K, Meuth SG, Martens K, Wiendl H, Hünig T.
Antigen-specific blockade of lethal CD8 T-cell mediated autoimmunity in a mouse model of multiple sclerosis.
J Immunol. 2009 May 15;182(10):6569-75.

Famulaturen

08/05	Unfallchirurgie, Hansekl. Stralsund
03/06	Gynäkologie/Geburtshilfe, Kreiskrankenhaus Roth
08/06 – 09/06	Innere Medizin, Powell River General Hospital / Kanada
03/07	Gynäkologie/Geburtshilfe, Korle Bu Teaching Hospital, Accra / Ghana
02/08	Neurologie, Juliusspital Würzburg

Auslandserfahrung

08/99 – 07/00	<i>Austauschschülerin</i> an der Kewanee High School, Illinois / USA
08/02 – 03/03	<i>Praktikum</i> in einem Labor für klinische Chemie der Universität von Trujillo; <i>Freiwilligenarbeit</i> für die NGO “Asociación Civil Regina Marie” (Prävention von Jugendkriminalität und Drogenabusus); <i>Praktikum</i> der Allgemeinmedizin in der Praxis von Dr. Morales Portilla; Trujillo / Peru

Fremdsprachen

Englisch	fließend (Auslandsaufenthalte in den USA, Kanada)
Spanisch	fließend (Auslandsaufenthalte in Peru, Argentinien)
Französisch	fließend (Auslandssemester in Frankreich)

Hobbies / Interessen

Sport	Tennis, Radfahren, Bergsteigen, Schifahren
Reisen	Südamerika, Afrika, Asien
Musik	Klavier
Literatur	

Heike Carola Eujen