

Der Einfluss der T-Zellavidität und der TLR-vermittelten Aktivierung Dendritischer Zellen der Haut auf die Funktion zytotoxischer T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Gerd Rechtsteiner

geboren am 30. August 1976

in Münsingen

Mainz, September 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2007

1 EINLEITUNG	6
1.1 Das Immunsystem	6
1.2 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex und Antigen-Prozessierung	8
1.2.1 MHC I	8
1.2.2 MHC II	9
1.3 Dendritische Zellen	10
1.4 Toll-Like Rezeptoren	12
1.5 T-Zellen	13
1.5.1 T-Zellpopulationen	13
1.5.2 Der T-Zell-Rezeptor	15
1.5.3 Korezeptoren	16
1.5.4 Entwicklung, Selektion und Homöostase naiver T-Zellen	17
1.5.5 TCR-Signaltransduktion	20
1.5.6 Aktivierung von T-Zellen	22
1.5.7 Funktion zytotoxischer T-Zellen	24
1.5.8 T-Zellavidität	26
1.5.9 T-Zell-Kompetition	27
1.5.10 Zytotoxisches T-Zellgedächtnis	28
1.5.11 Entstehung des T-Zellgedächtnisses	30
1.6 Mechanismen der Toleranz	32
1.7 Gezielte Initiierung adaptiver Immunantworten	34
1.8 Zielsetzung	36
2. MATERIAL UND METHODEN	37
2.1 Material	37
2.1.1 Mäuse	37
2.1.2 Zelllinien	37
2.1.3 Medien	37
2.1.4 Puffer	38
2.1.5 Antikörper	39
2.1.6 Reagenzien und Chemikalien	40
2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien	42
2.1.8 Verwendete Geräte	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Allgemeine Methoden	43
2.2.1.1 Durchflusszytometrie	43
2.2.1.2 ELISA	45
2.2.2 Methoden der Zellkultur	46
2.2.2.1 Allgemeines	46
2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	46
2.2.2.3 Kultur der Tumorzelllinien EL4 und EG.7	47
2.2.2.4 Differenzierung und Aktivierung von BMDCs	47
2.2.2.5 <i>In vitro</i> Kultur zytotoxischer T-Zellen	48
2.2.2.6 Anreinigung CD8 ⁺ -T-Zellen durch MACS	48
2.2.2.7 <i>In vitro</i> Aktivierung transgener T-Zellen	49
2.2.2.8 CFSE-Markierung und CFSE-Proliferationstest	49
2.2.2.9 [³ H]-Thymidin-Proliferationstest	51
2.2.3 Analysen zytotoxischer T-Zellen	51
2.2.3.1 DimerX-Färbung	51

2.2.3.2 FoxP3- Färbung	52
2.2.3.3 ⁵¹ Cr-Freisetzungstest	53
2.2.3.4 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest	54
2.2.3.5 Extrazelluläre IFN- γ -Analyse nach <i>in vitro</i> Peptid-Restimulation	55
2.2.3.6 Intrazelluläre IFN- γ -Analyse nach <i>ex vivo</i> Peptid-Restimulation	56
2.2.4 Tierexperimentelle Methoden	56
2.2.4.1 Blutentnahme	57
2.2.4.2 Organentnahmen und Zellpräparation	57
2.2.4.3 Entnahme von Knochenmark	57
2.2.4.4 Betäubung	57
2.2.4.5 Rasur	57
2.2.4.6 Transkutane Immunisierung	57
2.2.4.7 Immunisierung mit BMDCs	58
2.2.4.8 Adoptiv-Transfer	58
2.2.4.9 Injektion von Antikörpern	58
2.2.4.10 Tumorinokulation und –messung	58
2.2.4.11 Entnahme von Ohrbiopsien und PCR	58
3 ERGEBNISSE - EINFLUSS DER T-ZELLAVIDITÄT AUF DIE AKTIVIERUNG ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN	60
3.1 Charakterisierung der TCR-transgenen St-Mausstämme	60
3.1.1 St42-T-Zellen exprimieren mehr transgenen-TCR als St35-T-Zellen	62
3.1.2 Naive St35- und St42-CTLs zeigen ein leicht verändertes Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle	69
3.1.3 Die Expression des transgenen TCR ist über die ganze Lebensdauer der Tiere stabil	73
3.1.4 Die Anzahl transgener T-Zellen in der Peripherie ist in St42-Mäusen etwa 2- bis 3- mal höher als in St35-Mäusen	74
3.2 Aktivierung der St-CTLs <i>in vitro</i>	76
3.2.1 St35- und St42-CTLs proliferieren nach Stimulation mit PMA und Ionomycin oder α -CD3- und α -CD28-Antikörper in gleichem Maße	76
3.2.2 St35- und St42-CTLs zeigen bei Aktivierung mit APCs <i>in vitro</i> keine Unterschiede	79
3.3 Verhalten von St35 und St42 Zellen <i>in vivo</i>	88
3.3.1 St35- und St42-CTLs zeigen nach Aktivierung <i>in vivo</i> ein ähnliches Verhalten	88
3.3.2 Die Proliferation der St-CTLs <i>in vivo</i> hängt von der Anzahl der APCs ab	95
3.4 Konkurrenz von St-Zellen	99
3.4.1 St-Zellen zeigen <i>in vitro</i> keine Konkurrenz	99
3.4.2 Endogene CTLs werden nach adoptivem Transfer von St-CTLs nicht aktiviert	100
3.4.3 St42-CTLs proliferieren <i>in vivo</i> auf Kosten der St35-CTLs	101
3.4.4 In der Konkurrenz unterlegene St35-CTLs sind bis zu 40 Tage nach Immunisierung immer noch in der Peripherie zu finden	107
3.4.5 St35-CTLs proliferieren <i>in vivo</i> bei Transfer größerer Mengen an St35-Zellen auf Kosten der St42-CTLs	111
4. DISKUSSION – EINFLUSS DER T-ZELLAVIDITÄT AUF DIE AKTIVIERUNG ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN	116
4.1 Die St35- und St42-T-Zellen	116
4.2 Aktivierung der St-T-Zellen <i>in vitro</i>	118
4.3 Aktivierung der St-T-Zellen <i>in vivo</i>	118
4.4 Konkurrenz naiver zytotoxischer T-Zellen um APCs	122

5 ERGEBNISSE - TRANSKUTANE IMMUNISIERUNG	128
5.1 Aktivierung transgener CD8⁺-T-Zellen durch transkutane Immunisierung	128
5.1.1 Die transkutane Immunisierung mit SGPSNTPPEI-Peptid führt zur systemischen Aktivierung von adoptiv transferierten St42-CTLs	130
5.1.2 St42-CTLs proliferieren innerhalb der ersten 48 Stunden nach transkutaner Immunisierung in den drainierenden Lymphknoten und verteilen sich danach systemisch	135
5.1.3 24 Stunden nach der transkutaner Immunisierung findet sich das Antigen im drainierenden Lymphknoten wieder	138
5.2 Tumorprotektive Kapazität einer transkutan induzierten CTL-Antwort im transgenen Tumormodell	141
5.2.1 Die transkutane Immunisierung führt zu einem reduzierten Tumorwachstum in therapeutischen Tumormodell	142
5.2.2 Die transkutane Immunisierung induziert eine protektive Antwort in einem prophylaktischen Tumormodell	143
5.3 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die CTL-Antwort nach transkutaner Immunisierung	145
5.3.1 Die Injektion des PC61-Antikörpers führt zu einer Verstärkung der durch die transkutane Immunisierung induzierten CTL-Antwort	145
5.3.2 Die Injektion des PC61-Antikörpers führt zur Reduktion der Zahl der regulatorischen T-Zellen, nicht zu deren vollständiger Depletion	151
5.3.3 CD4 ⁺ -T _{reg} inhibieren die transkutane Immunisierung mit einem MHC I-Epitop	153
5.3.4 CD8 ⁺ CD25 ⁺ -Zellen inhibieren die Induktion einer CTL-Antwort durch die transkutane Immunisierung in A- α -Mäusen	156
6. DISKUSSION – TRANSKUTANE IMMUNISIERUNG	161
6.1 Die transkutane Immunisierung induziert eine systemische CTL-Antwort	161
6.2 Die transkutane Immunisierung vermittelt Tumorprotektion	162
6.3 Der Mechanismus der T-Zellaktivierung nach transkutaner Immunisierung ist ungeklärt	163
6.4 Exprimieren Langerhanszellen TLR7?	164
6.5 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen	165
6.6 Die transkutane Immunisierung induziert keine Gedächtnisantwort	168
7. ZUSAMMENFASSUNG	171
8. LITERATURVERZEICHNIS	173
9. ABKÜRZUNGEN	205

1 Einleitung

Infektionskrankheiten gehören auf der einen Seite nach wie vor zu den größten Verursachern gesundheitlicher Probleme, auf der anderen Seite ist die Eindämmung oder gar die vollständige Ausrottung verschiedener Infektionskrankheiten durch Impftherapien die wohl größte Erfolgsgeschichte der Medizin überhaupt.

Es gibt jedoch für viele Erkrankungen, die vor allem in Entwicklungsländern eine wichtige Rolle spielen, bis zum heutigen Tag keinen effektiven Impfstoff. Darüber hinaus treten immer häufiger neue und Erreger auf, gegen die kein Impfschutz möglich ist und deren rasche Verbreitung durch die hohe Mobilität der Menschen extrem begünstigt wird. Zudem scheint der Einsatz von Erregern als biologische Waffe wahrscheinlicher als je zuvor.

Es ergibt sich also ein hoher und immer neuer Bedarf an sicheren, effektiven, schnell zu generierender, sowie günstig und in kürzester Zeit in großer Menge produzierbaren Impfstoffen. Moderne Impfmethode sollten also auf einem generellen Funktionsprinzip beruhen, dass sich durch Modifikationen auf neue Erreger übertragen lässt. Hierfür ist natürlich zunächst ein umfassendes und detailliertes Verständnis der verschiedenen Komponenten des Immunsystems sowie deren Funktion von Nöten.

In der vorliegenden Dissertation wurden im Tiermodell grundlegende Prinzipien der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen untersucht, sowie ein neues voll synthetisches Impfverfahren entwickelt.

Einleitend werden zunächst die Grundzüge des Immunsystems skizziert, sowie die verschiedenen relevanten Komponenten und Vorgänge vorgestellt und erläutert.

1.1 Das Immunsystem

Fast alle Organismen werden von den unterschiedlichsten Parasiten und Pathogenen attackiert. Um sich vor, in vielen Fällen lebensbedrohlichem, Befall anderer Organismen zu schützen, entwickelten sich im Laufe der Evolution die verschiedensten Abwehr- und Schutzmechanismen. Die Zahl und Variation potenzieller Pathogene und Parasiten nimmt dabei mit der Entwicklungsstufe des Organismus zu. Säugetiere verfügen dementsprechend über ein äußerst komplexes und vielschichtiges Abwehrnetzwerk. Durchbricht ein Mikroorganismus die

physikalischen und chemischen Barrieren und dringt somit in den Organismus ein kommt das Immunsystem zum Tragen.

Die ersten Abwehrreaktionen erfolgen durch das nicht-adaptive Immunsystem. Die Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems erkennen über spezifische Rezeptoren ein bestimmtes Spektrum an Erregern anhand molekularer Strukturen, so genannter „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP). Bindet ein entsprechender Rezeptor seinen Liganden, kommt es zur Aktivierung der Zellen und zur Bekämpfung des eingedrungenen Erregers durch phagozytische Aktivität und die Ausschüttung von Radikalen. Die Zellen sezernieren darüber hinaus eine Vielzahl verschiedener löslicher Mediatoren, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen und damit die Einwanderung weiterer Zellen des Immunsystems in den Entzündungsherd vermitteln. Die Spezifität und damit die Wirkung des nicht-adaptiven Systems sind jedoch auf ein relativ enges Spektrum an Erregern begrenzt. Um auf die enorm hohe Anzahl an verschiedensten, sich zum Teil sehr schnell verändernden, Pathogenen angemessen reagieren zu können, ist eine weitaus dynamischere Reaktion notwendig. Diese Leistung wird vom adaptiven Immunsystem vollbracht. Das adaptive Immunsystem umfasst einen humoralen (Antikörper aus B-Zellen), sowie einen zellulären Zweig (T-Zellen) und wird durch die nicht-adaptiven Reaktionen aktiviert.

Das adaptive System beruht auf der Aufrechterhaltung eines extrem diversen Pools an T- und B-Zellen vielfältigster Spezifität durch die so genannte somatische Rekombination der Gene des T-Zell-Rezeptors (TCR) und der Immunglobuline der B-Zellen. Bei Antigen-Kontakt kommt es zur klonalen Vermehrung und Aktivierung der für das jeweilige Antigen spezifischen Zellen, und somit zu einer spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Abwehrreaktion.

Während die von den B-Zellen produzierten Antikörper extrazelluläre Antigene erkennen, werden intrazellulär vorkommende Pathogene von zytotoxischen T-Zellen (CTL) bekämpft.

Nachdem körpereigene Strukturen nicht gegen die Angriffe des Immunsystems geschützt sind, ist die Fähigkeit des Immunsystems eigene von fremden Antigenen unterscheiden zu können essentiell für das Funktionieren und Überleben des gesamten Organismus.

1.2 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex und Antigen-Prozessierung

1.2.1 MHC I

Mit Ausnahme der Erythrozyten finden sich auf der Oberfläche aller Zellen des Menschen und der Maus so genannte MHC Proteine (major histocompatibility complex beziehungsweise Hauptgewebeverträglichkeitskomplex) der Klasse I. Diese Moleküle binden Peptide aus in der Zelle synthetisierten Proteinen und erlauben damit deren Erkennung durch zytotoxische T-Zellen.

Die heterodimeren MHC I-Moleküle gehören zur Immunglobulin-Familie und bestehen aus einer α -Kette sowie einem nicht kovalent assoziierten β_2 -Mikroglobulin. Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären Immunglobulindomänen (α_1 bis α_3) und verfügt über eine Transmembrandomäne. Die beiden membrandistalen Domänen (α_1 und α_2) bilden eine Furche, in der Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren binden können (vergleiche Abbildung 1.1). Die Affinität der MHC-Peptid-Bindung hängt von der Aminosäuresequenz des Peptids ab (Falk et al., 1991). Die Polygenie und der Polymorphismus des MHC sorgen für ein breites Spektrum an verschiedenen Peptidbindungstaschen und gewährleisten so die zuverlässige Erkennung möglichst vieler Pathogene.

Im Menschen wird der MHC auch als HLA (human leukocyte antigen) bezeichnet, in Mäusen als H2 (histocompatibility 2). Die drei Hauptloci werden im Menschen als HLA-A, -B und -C, in der Maus als H2-K, -D und -L bezeichnet. Zurzeit sind beim Menschen 478 HLA-A-, 805 HLA-B- und 256 HLA-C-Allele bekannt (<http://www.anthonynolan.com/HIG/>). Die Gene des MHC sind kodominant, jeder Mensch exprimiert bis zu sechs verschiedene MHC-Klasse I-Moleküle.

Die auf den MHC I-Proteinen gebundenen Peptide stammen aus zellulären Proteinen. Ausgediente und fehlgefaltete Proteine werden zunächst ubiquitinyliert und dann durch das Proteasom verdaut (Schubert et al., 2000; Yewdell et al., 2001; Yewdell, 2002; Kloetzel, 2004). Nach dem Verdau im Proteasom, werden die entstandenen Peptide durch Aminopetidasen verkürzt (Kloetzel, 2004) und schließlich über den TAP (Transporter associated with antigen processing) in das Endoplasmatische Retikulum transportiert (Momburg et al., 1994), wo sie weiter prozessiert werden können (Kloetzel, 2004) und schließlich an neu synthetisierte MHC I-Moleküle binden.

Die fertigen MHC I-Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und repräsentieren dort das Expressionsmuster der jeweiligen Zelle.

Entsprechend den obigen Ausführungen wäre also keine Präsentation exogener Antigene auf MHC I-Molekülen einer Zelle möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es dennoch zur Präsentation nicht zelleigener Antigene auf MHC I-Molekülen von APCs kommt. Es ist bestimmten Zellen also möglich, exogenes Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und auf MHC I-Molekülen zu präsentieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Cross-Präsentation (Bevan, 1976; Bevan, 2006; Heath and Carbone, 2001). Die Cross-Präsentation ist essentiell für die Induktion von CD8⁺-T-Zellantworten gegen Tumorantigene sowie gegen Pathogenen, die die APCs nicht direkt infizieren (Schroder and Bowie, 2005; Le Bon et al., 2003; Winau et al., 2006; Schulz et al., 2005; Heath et al., 2004). Es ist nicht genau bekannt, auf welchem Wege das Antigen aus den Endosomen schließlich auf die MHC I-Molekülen gelangt (Groothuis and Neefjes, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass sich der Mechanismus der Cross-Präsentation effektiv für Immunisierungsansätze verwenden lässt, so können Immunkomplexe aus Antikörpern und Antigenen erfolgreich zur Induktion einer CD8⁺-T-Zellantwort eingesetzt werden (Schuurhuis et al., 2006).

1.2.2 MHC II

Die MHC II-Proteine werden lediglich auf antigenpräsentierenden Zellen (dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen) exprimiert. Die auf den MHC II-Molekülen präsentierten Peptide entstammen dem endosomalen Verdau aus pinocytose beziehungsweise phagozytierten Proteinen und Organismen. Die Proteine werden dabei im Phagolysosom von sauren Proteasen und Cathepsinen zu Peptiden verdaut. Diese binden an MHC II-Moleküle und werden schließlich auf die Zelloberfläche transportiert (Chapman, 2006; Pieters, 1997). Die MHC II-Peptid-Komplexe dienen der Erkennung durch T-Helferzellen (Th) und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Aktivierung verschiedener Zellen des Immunsystems.

MHC II-Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette mit jeweils 2 extrazellulären Immunglobulin-domänen sowie je einer Transmembrandomäne. Die beiden membrandistalen Domänen (α_1 und β_1) bilden analog zu den MHC I-Molekülen eine Peptid-bindende Furche. Hier werden Peptide bis zu einer Größe von etwa 20 Aminosäureresten gebunden (vergleiche Abbildung 1.1). Die MHC II-Gene werden im Menschen HLA-DR, -DP und -DQ genannt, in der Maus H2-A und -E.

Zurzeit sind im Menschen 3 HLA-DRA-, 542 HLA-DRB-, 23 HLA-DPA1-, 125 HLA-DPB1-, 34 HLA-DQA-1 und 73 HLA-DQB1-Allele bekannt (<http://www.anthonynolan.com/HIG/>).

Neben den MHC I- und MHC II-Molekülen, die auch als klassische MHC-Moleküle bezeichnet werden, gibt es verschiedene, nichtklassische MHC-Moleküle. Diese sind weitaus weniger polymorph, binden zum Teil keine Peptide und erfüllen nicht immer eine immunologische Funktion (Alfonso and Karlsson, 2000; Braud et al., 1999; Ehrlich and Lemonnier, 2000; Maenaka and Jones, 1999).

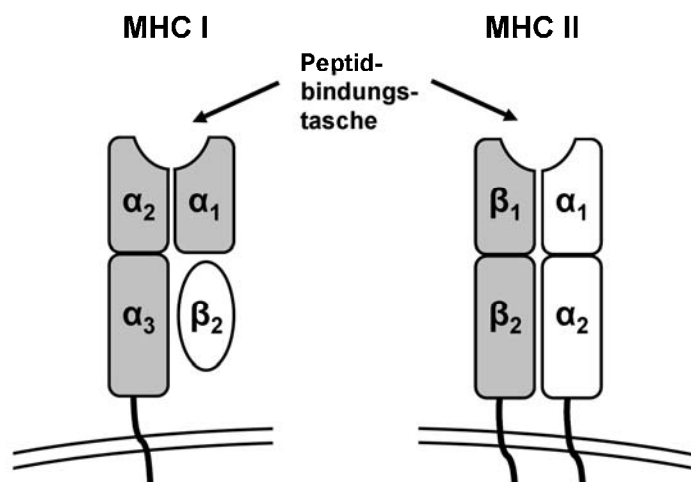


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der MHC I- und MHC II- Proteine

Auf der linken Seite ist das aus der α -Kette sowie aus dem β_2 -Mikroglobulin bestehende MHC I-Molekül abgebildet. Die membrandistalen α_1 - und α_2 -Domänen bilden die seitlich geschlossene Peptidbindungstasche. Auf der rechten Seite ist das aus einer α - und einer β -Kette aufgebaute MHC II-Molekül dargestellt, hier bilden die α_1 - und die β_1 -Domäne eine seitlich offene Peptidbindungstasche (Janeway et al., 2001)

1.3 Dendritische Zellen

Bei der Aktivierung naiver T-Zellen spielen, neben den Makrophagen, die Dendritischen Zellen (DCs) eine herausragende Rolle. Die DCs entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und sind als unreife DCs in den meisten Geweben des Körpers zu finden. Sie verfügen über längliche Ausläufer, denen sie ihren Namen verdanken („dendron“, griechisch für Baum). DCs nehmen unspezifisch Proteine und kleine Partikel durch Pinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose (Fc-Rezeptor, Mannoserezeptor, CD14,...) auf (Banchereau et al., 2000).

Unreife DCs exprimieren eine Reihe verschiedener Rezeptoren, welche die Aktivierung der Zellen vermitteln können. Die Aktivierung kann dabei über andere Komponenten des Immunsystems vermittelt werden. So kann die Aktivierung über verschiedene Zytokine (unter anderem IL-1 β , IL-6, TNF- α), welche von Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems ausgeschüttet werden, erfolgen. Weitere Möglichkeiten der Aktivierung bestehen in der Bindung von Antikörper-Antigen-Komplexen an Fc-Rezeptoren sowie der CD40-CD40L-Wechselwirkung mit CD4⁺-T-Zellen. Darüber hinaus können DCs durch apoptotische oder nekrotische Zellen, sowie Zellfragmente, aktiviert werden. Schließlich verfügen die DCs über eine Vielzahl an Rezeptoren, die die direkte Erkennung von Pathogenen erlauben. Hierbei werden bestimmte Fragmente des entsprechenden Mikroorganismus, so genannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) direkt von Rezeptoren, so genannten „pattern recognition receptors“ (PRRs) gebunden und induzieren ein intrazelluläres Signal in der DC. Man kennt verschiedene Rezeptorfamilien, darunter ist neben der NOD-like- und RIG-like-Rezeptorenfamilie, die Toll-like Rezeptorfamilie (TLR) (Creagh and O'Neill, 2006) die bekannteste.

Werden die DCs aktiviert, kommt es zur Reifung der Zellen. Diese macht sich zunächst dadurch bemerkbar, dass die Antigenaufnahme gestoppt wird und die Antigenprozessierung und –präsentation zunimmt (Banchereau et al., 2000). Zudem werden auf der Oberfläche der jetzt reifen DCs verstärkt kostimulatorische Moleküle wie zum Beispiel CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) exprimiert (Benvenuti et al., 2004). Die reifen DCs fangen zudem an, aus dem Gewebe auszuwandern. Damit geht die erhöhte Expression verschiedener Chemokinrezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle einher (Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Diese ermöglichen die gezielte Wanderung der DCs in die T-Zell-Zone der Lymphknoten (Gunn et al., 1998). Hier interagieren die DCs mit den T-Zellen und ermöglichen so deren Aktivierung. Die DCs sezernieren zudem Zytokine und Chemokine (unter anderem IL-12, IL-6, IL-10, TNF- α , RANTES), um weitere Zellen anzulocken und die induzierten Antworten gezielt zu beeinflussen.

Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen lassen den Schluss zu, dass die DCs, die aus den Geweben in die Lymphknoten einwandern, dort nicht unbedingt auch die T-Zellen aktivieren. So konnte gezeigt werden, dass Antigene von sesshaften Lymphknoten-DCs präsentiert werden. Zudem ist bekannt, dass Antigene auf

verschiedenen Wegen zwischen Zellen ausgetauscht werden können (Neijssen et al., 2005; Iezzi et al., 2006; Allan et al., 2006; Dudda et al., 2005).

Hierbei kommt den DCs eine besondere Rolle zu, sie stellen die einzige Zellpopulation dar, die zur Cross-Präsentation befähigt ist. Es wird vermutet, dass DCs Antigendepots im Zytosol anlegen können um das Antigen zu späteren Zeitpunkten zu prozessieren und zu präsentieren (Herter et al., 2005; Lelouard et al., 2002; Lelouard et al., 2004).

Man unterscheidet zurzeit drei Hauptpopulationen an DCs: Die sich aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen entwickelnden myeloiden, die lymphoiden Dendritischen Zellen sowie, die Langerhanszellen monozytären Ursprungs.

Anhand von verschiedenen Oberflächenantigenen lassen sich myeloide ($CD11b^+CD11c^+CD8^-DEC205^-$) von lymphoiden ($CD11b^-CD11c^+CD8^+DEC205^+$) DCs unterscheiden. Diese beiden Populationen spalten sich in weitere Subpopulationen auf. Die verschiedenen Populationen verteilen sich auf verschiedenste Organe und scheinen definierte Aufgaben zu erfüllen.

Die Langerhanszellen finden sich ausschließlich in der Epidermis, dort befinden sie sich in enger Nachbarschaft zu dermalen DCs. Nachdem sich beiden Zellarten in der Expression verschiedener Oberflächenantigene ($CD11c$, $CD205$, $CD207$) nur marginal unterscheiden können sie durchflusszytometrisch nicht eindeutig voneinander unterschieden werden (Kissenpfennig and Malissen, 2006).

Inaba et al. konnten ein Protokoll erarbeiten, das, mit Hilfe von GM-CSF, die *in vitro* Differenzierung Dendritischer Zellen aus Knochenmarkszellen der Maus erlaubt. Die erhaltenen „bone marrow-derived dendritic cells“ (BMDCs) ähneln in ihrem Phänotyp und ihrer Funktion den myeloiden DCs.

1.4 Toll-Like Rezeptoren

Die Erkennung verschiedener Mikroorganismen durch die Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems erfolgt über die Bindung spezifischer molekularer Muster (PAMPs) durch spezifische Rezeptoren (PRRs). Von den verschiedenen Rezeptorfamilien ist die TLR-Familie (Rock et al., 1998) am besten charakterisiert. Der Begriff TLR stammt aus der Entwicklungsbiologie, das dort zuerst beschriebene Toll-Protein in *Drosophila melanogaster* (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992; Hashimoto et al., 1988) weist Homologien zu den TLRs auf (Medzhitov et al., 1997).

Allen TLRs ist eine extrazelluläre Leucin-reiche repetitive Sequenz zur Ligandenbindung sowie ein zytoplasmatisches Aktivierungsmotiv, die „Toll/IL-1 receptor homology“-Domäne (TIR) zur Signalweiterleitung gemein (O'Neill, 2006). Die Weiterleitung des Signals erfolgt dann über die Adaptormoleküle MyD88 und TIRAP oder über TRIF und TRAM (Fitzgerald et al., 2003; Horng et al., 2001; Medzhitov et al., 1998; Yamamoto et al., 2003). Im Wesentlichen unterscheidet man zwei Hauptwege der TLR-vermittelten Signaltransduktion, den MyD88-abhängigen, sowie den MyD88-unabhängigen. Die induzierte Signalkaskade führt schließlich zur Aktivierung von NF- κ B, AP-1 und IRF-3 (Fitzgerald et al., 2003; Kawai et al., 2001). Zurzeit sind beim Menschen 11 verschiedene TLRs bekannt, sie erkennen verschiedenste molekulare Strukturen. Die TLRs unterscheiden sich zudem stark in ihrer zellulären Verteilung. So zeigen die unterschiedlichen DC-Subpopulationen jeweils unterschiedliche Expressionsmuster der TLRs. Somit ist eine adäquate Reaktion des Immunsystems gegen die entsprechenden Pathogene gewährleistet. Es konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene Zellen, die nicht dem Immunsystem zugeordnet werden, TLRs exprimieren und auf die Liganden reagieren (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Mempel et al., 2003).

Vor kurzem wurden antagonistische TLR-Liganden beschrieben (Macagno et al., 2006), die TLRs scheinen also auch zur Inhibierung der Immunantwort fähig zu sein. Darüber hinaus werfen eine Vielzahl von Studien die Frage auf, ob zur Liganden-Erkennung der TLRs weitere Moleküle benötigt werden, und ob der Liganden-Bindung intrazellulär vorhandener TLRs der spezifische Transport des Liganden in die Zelle vorausgehen muss. Die Funktion der TLRs scheint also sehr reguliert und vielschichtig zu sein.

Nachdem sich während der letzten Jahre die Forschung vor allem auf die TLRs konzentriert hatte, treten nach und nach andere PRRs in den Fokus des Interesses. Es konnte vor allem gezeigt werden, dass die Erkennung bakterieller und viraler PAMPs auch durch die intrazellulär vorkommenden Rezeptoren der NOD-like- und RIG-like-Familie erfolgen kann (Creagh and O'Neill, 2006).

1.5 T-Zellen

1.5.1 T-Zellpopulationen

Die am häufigsten vorkommende T-Zellpopulation stellen die so genannten $\alpha\beta$ -T-Zellen dar. Der Name gründet auf der Expression des antigenspezifischen Rezeptors,

der aus einer α - und einer β -Kette besteht. T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen durch Interaktion des TCR mit einem Komplex aus einem MHC-Protein und einem Peptid (Garboczi et al., 1996).

Die $\alpha\beta$ -T-Zellen zudem aufgrund der Expression der Oberflächenantigene CD4 und CD8 weiter unterschieden. Die CD8-positiven Zellen, die zytotoxischen T-Zellen greifen virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen direkt an und töten sie ab. Die CD4-positiven Zellen, die so genannten Helferzellen werden klassisch in zwei Untergruppen unterteilt. Die Th1-Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) und aktivieren somit Makrophagen (Munoz-Fernandez et al., 1992; Stout and Bottomly, 1989), sie unterstützen zudem die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Andreasen et al., 2000). Th2-Zellen aktivieren B-Zellen (Parker, 1993). Sie produzieren die Interleukine 4, 5 und 13, und forcieren dadurch die Antikörperproduktion (Croft and Swain, 1991).

Die Differenzierung einer naiven Helferzelle in den jeweiligen Subtyp hängt unter anderem vom Zytokin-Milieu während deren Aktivierung ab. IL-12 aus Makrophagen oder Dendritischen Zellen und IFN- γ aus zytotoxischen T-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK) begünstigen die Entstehung von Th1-Zellen. Findet die Aktivierung dagegen in Gegenwart von IL-4 statt, so entstehen bevorzugt Th2-Zellen (O'Garra and Arai, 2000).

Neben den klassischen Th1- und Th2-Zellen kennt man inzwischen auch die Th3-Zellen, diese haben suppressive Funktion. Sie werden anhand der Produktion von IL-10 beziehungsweise TGF- β in zwei Subpopulationen, die Tr1- (IL-10) und Th3- (TGF- β) Zellen weiter unterteilt (Faria and Weiner, 2005). Neben diesen suppressiven T-Zellpopulationen treten die so genannten natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen auf.

Die Familie der Helferzellen wurde vor kurzem um eine Gruppe erweitert. Die Th17, Zellen stellen eine Subpopulation der Th2-Zellen dar. Ihre Differenzierung hängt von IL-25 ab, detaillierte Informationen über die Funktion und die Relevanz der Th17-Population liegen noch nicht vor, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zellen bei der Antwort gegen Helminthen-Befall eine bedeutende Rolle spielen (Tato et al., 2006; Tato and O'Shea, 2006; Fallon et al., 2006; Owyang et al., 2006; Mangan et al., 2006; Bettelli et al., 2006).

Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen kennt man die $\gamma\delta$ -T-Zellen. Der TCR dieser Zellen setzt sich aus einer γ - sowie einer δ -Kette zusammen. Die Rezeptoren der $\gamma\delta$ -T-Zellen sind

weitaus weniger divers als die der $\alpha\beta$ -T-Zellen. Die $\gamma\delta$ -T-Zellen erkennen, unter anderem Lipide und Nukleotide. Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen finden sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen hauptsächlich in peripheren Geweben und nur selten in lymphatischen Organen (Hayday, 2000). Ferner konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auch als APCs fungieren können (Moser and Brandes, 2006).

1.5.2 Der T-Zell-Rezeptor

Der TCR der $\alpha\beta$ -T-Zellen ist aus je einer α - und einer β -Kette aufgebaut. Das Heterodimer besteht aus zwei membranständigen Glykoproteinen die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Beide Ketten umfassen zwei Immunglobulindomänen, eine Transmembrandomäne sowie eine kurze zytosolische Sequenz. Die membranständigen Immunglobulindomänen (C_α , C_β) weisen eine konservierte Sequenz auf, dagegen sind die membrandistalen Domänen (V_α , V_β) hoch variabel und vermitteln die Bindung an den MHC·Peptid-Komplex. Diese Bindung ist vor allem von den drei Schleifen zwischen den β -Faltblättern der V-Domänen abhängig. Diese werden daher als CDRs (complementarity determining regions) bezeichnet. Sie weisen eine hohe Varianz der Aminosäuresequenzen auf (Garcia et al., 1996).

Die Gene für die V-Domänen der TCRs sind auf viele Segmente verteilt. Erst durch die somatische Rekombination wird ein exprimierbares TCR-Gen erzeugt. Die verschiedenen Gensegmente werden als V- (variable), D- (diversity) und J- (joining) Segmente bezeichnet.

Die β -Kette wird aus je einem V-, D- und J-Segment gebildet, die α -Kette dagegen besteht aus je einem V- und einem J-Segment (Davis and Bjorkman, 1988). Die hohe Variabilität von etwa 10^{14} verschiedenen TCRs wird durch beliebige Kombination der verschiedenen Segmente sowie durch zufälliges Einfügen beziehungsweise Entfernen einzelner Nukleotide zwischen den Segmenten erreicht. Die somatische Rekombination wird vor allem durch einen Enzymkomplex aus RAG1 und RAG2 (recombination activating genes) vermittelt (Rowen et al., 1996; Shinkai et al., 1992). Im Gegensatz zur Hypermutation in den B-Zellen findet eine Mutation der TCRs reifer T-Zellen nicht statt.

Die TCRs der CD4- und CD8-T-Zellen haben denselben Ursprung, die Spezifität der TCRs für MHC I- beziehungsweise MHC II-Moleküle ergibt sich also lediglich aus der Varianz der CDRs.

Sowohl α - als auch β - Kette des TCR verfügen lediglich über sehr kurze, funktionslose intrazelluläre Domänen. Zur Transduktion eines Signals sind also weitere membranständige Komponenten nötig. So sind die α - und β -Ketten des TCR mit sechs weiteren Molekülen zum TCR-Komplex assoziiert.

Neben vier CD3-Ketten ($\gamma, \delta, \epsilon, \epsilon$) sind zwei ξ -Ketten im Komplex enthalten. Die CD3-Moleküle weisen jeweils eine extrazelluläre Immunglobulindomäne, sowie eine intrazelluläre ITAM-Sequenz (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) auf. Die beiden identischen ξ -Ketten verfügen jeweils über einen kurzen extrazellulären Abschnitt, der über eine Transmembrandomäne mit einer größeren intrazellulären Domäne verbunden ist. Diese enthält drei ITAM-Sequenzen. Die beiden ξ -Ketten sind an den Transmembrandomänen über eine Disulfidbrücke kovalent aneinander gebunden (siehe Abbildung 1.2). Die ITAM-Sequenzen weisen das allgemeine Schema ...YXX[L/V]X6-9YXX[L/V]... auf, welches zuerst im B-Zell-Rezeptor-Komplex beschrieben wurde (Reth, 1989). Bei Aktivierung des Rezeptors werden die Tyrosin-Reste des Motivs phosphoryliert und erlauben die Bindung verschiedener Kinasen über deren SH2-Domänen. Die Kinasen vermitteln schließlich die Weiterleitung des Signals.

1.5.3 Korezeptoren

Die Bindung der TCRs an den MHC·Peptid-Komplex wird durch Korezeptoren unterstützt. Helferzellen exprimieren den CD4-Korezeptor, zytotoxische T-Zellen den CD8-Korezeptor. Die entsprechenden membranständigen Korezeptoren binden sowohl an den TCR als auch an das jeweilige MHC-Molekül und erhöhen damit die Bindungsstärke des TCR an den MHC·Peptid-Komplex bis zu einem Faktor von 100. Die Bindung des Korezeptors an das MHC-Molekül ist prinzipiell vom gebundenen Peptid unabhängig.

CD4 ist ein Monomer und aus vier Domänen (D1-D4) aufgebaut. Die beiden dicht gepackten membrandistalen Domänen (D1 und D2) sind über ein kurzes, flexibles Verbindungsstück an die, ebenfalls dicht gepackten, membranständigen Domänen gebunden (siehe Abbildung 1.2). Die zytosolische Domäne ermöglicht die Interaktion mit der Lck-Kinase. Die D1-Domäne bindet an die β_2 -Domäne des MHC II-Moleküls.

CD8 ist ein aus einer α - und einer β -Kette aufgebauter Heterodimer. Neben der heterodimeren Form tritt CD8 jedoch auch als α - α -Homodimer auf (Gao et al., 1997). Jede Kette besteht aus einer Immunglobulindomäne, die über eine lange

Polypeptidkette mit der Transmembrandomäne verbunden ist (siehe Abbildung 1.2). Die zytosolische Domäne der α -Kette ermöglicht die Interaktion mit der Lck-Kinase. CD8 bindet vermutlich über die α -Kette an die α_3 -Domäne des MHC I (Zamoyska, 1998).

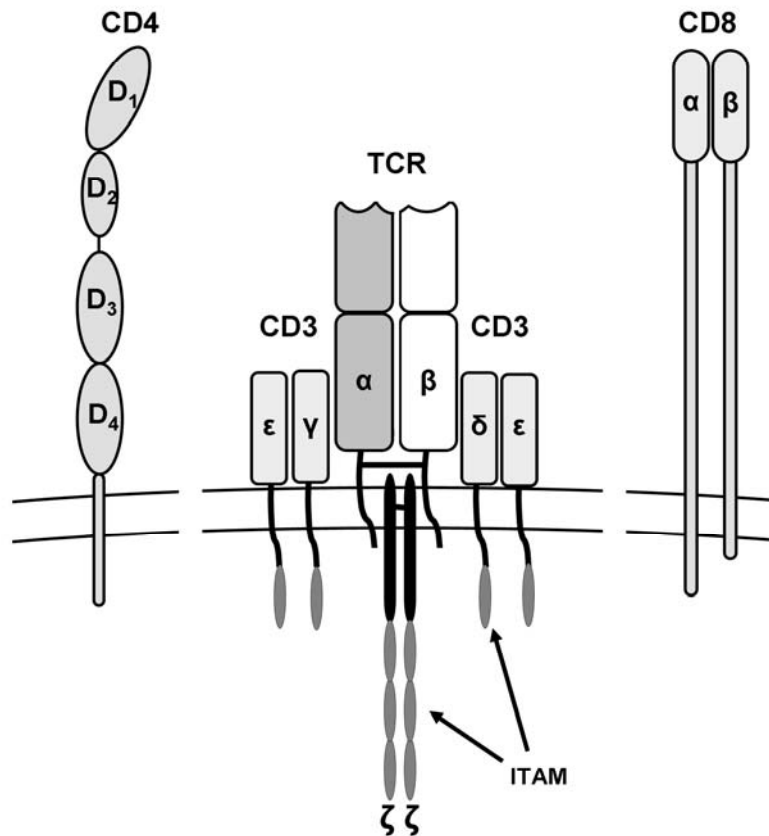


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des TCR-Komplexes und der Korezeptoren

Auf der linken Seite ist der CD4-Korezeptor schematisch dargestellt, es handelt sich dabei um ein membranständiges Monomer aus 4 Domänen, die membrandistale Domäne bindet an die β_2 -Domäne des MHC II-Moleküls. Der zytosolische Abschnitt ermöglicht die Bindung an die Kinase Lck.

Auf der rechten Seite ist der CD8-Korezeptor dargestellt, es handelt sich dabei um ein Heterodimer, die α -Kette bindet die α_3 -Domäne des MHC I-Molekül, die zytosolische Abschnitt der α -Kette vermittelt die Bindung an Lck.

In der Mitte ist der TCR-Komplex dargestellt, die kovalent verbundenen α - und β -Ketten sind dabei mit vier CD3- und zwei ζ -Ketten assoziiert. Jede CD3-Kette verfügt über eine zytosolisch gelegene ITAM-Sequenz, die beiden ζ -Ketten verfügen über jeweils 3 ITAM-Sequenzen (Janeway et al., 2001; Cole and Gao, 2004; Schrum et al., 2003).

1.5.4 Entwicklung, Selektion und Homöostase naiver T-Zellen

Die Entwicklung der T-Zellen beginnt mit der Einwanderung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Diese Thymozyten exprimieren noch keinen TCR und keinen der beiden TCR-Korezeptoren, sie werden daher als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet. Die Entwicklung der Thymozyten beginnt in der kortiko-medullären Grenzregion mit der Aktivierung der RAGs und somit mit

der somatischen Rekombination der TCR-Gene. Zunächst wird die β -TCR-Kette aus einem V-, einem D- und einem J-Segment rekombiniert. Zeigt sich diese in einem, zusammen mit einer prä-TCR- α -Kette (pT α), zusammengefügt prä-TCR funktionell wird die somatische Rekombination zunächst eingestellt und die Zelle teilt sich einige Male. Hieran schließt sich die Rekombination der α -Kette aus je einem V- und einem D-Segment an. Die Expression eines funktionsfähigen TCRs erlaubt die weitere Entwicklung des Thymozyten. Sollte die α -Kette nicht funktionsfähig sein, werden die RAGs erneut aktiviert. Es kommt solange zur Rekombination bis eine funktionelle α -Kette gebildet wird. Geschieht dies nicht innerhalb von etwa vier Tagen, stirbt die Zelle (Starr et al., 2003).

Noch während der Rekombination der α -Kette beginnen die Thymozyten den CD4- sowie den CD8-Korezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Die Zellen werden dementsprechend als doppelt positive Thymozyten bezeichnet.

Im Folgenden schließen sich positive und negative Selektion an. Diese Vorgänge gewährleisten die Erkennung der MHC-Moleküle durch die TCRs (positive Selektion) sowie die Eliminierung selbst-reaktiver T-Zellen (negative Selektion). Die Vorgänge der positiven und negativen Selektion werden von nicht-hämatopoetischen Thymus-Epithelzellen („TEC's“, Thymic Epithelial Cells) und mesenchymalen Fibroblasten sowie von Makrophagen und Dendritischen Zellen vermittelt (Starr et al., 2003).

Die positive Selektion findet im Kortex statt. Bindet der TCR nicht an einen Komplex aus einem MHC-Molekül und einem körpereigenen Antigen, führt dies zum Absterben der Zellen durch „Vernachlässigung“ („Death by Neglect“). Überstehen die Thymozyten die positive Selektion wandern sie in die kortiko-medulläre Region ein. Hier werden fast alle körpereigenen Antigene unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors AIRE (Derbinski et al., 2005; Anderson et al., 2005) ektopisch exprimiert. Bindet ein Thymozyt mit zu hoher Affinität einen Komplex aus MHC-Molekül und Selbst-Peptid, wird Apoptose induziert und die Zelle stirbt. Dieser Mechanismus verhindert also die Reifung autoreaktiver T-Zellen. Schätzungen zufolge überstehen lediglich etwa zwei Prozent aller Thymozyten die Selektionsvorgänge. Die Zellen exprimieren fortan nur noch einen der beiden Korezeptoren und verlassen den Thymus nach etwa 3 Wochen als reife, naive T-Zellen (Shortman et al., 1990; Strasser, 1995; Surh and Sprent, 1994). Welche Mechanismen die Herunterregulation des jeweils anderen Korezeptors vermitteln ist noch nicht abschließend geklärt, es werden jedoch zwei Modelle diskutiert. Das

stochastische Modell geht davon aus, dass einer der beiden Korezeptoren spontan herunterreguliert wird und sich die Zellen mit dem jeweilig verbleibenden Korezeptor den Selektionsprozessen unterziehen. Auf der anderen Seite wird angenommen, dass die erfolgreiche Bindung eines TCR an ein MHC I-Molekül ein Signal zur Herunterregulation des CD4-Moleküls zur Folge hat, umgekehrt würde die Bindung an MHC II-Moleküle die Herunterregulation des CD8-Moleküls zur Folge haben (von Boehmer and Kisielow, 1993). Nach dem Verlassen des Thymus zirkulieren die naiven T-Zellen durch Blut- und Lymphsystem, dabei findet der Übertritt vom Blut in die Lymphe in den Lymphknoten statt. Die T-Zellen verlassen dabei durch die Venolen des Lymphknotens (high endothelial venules, HEV) den Blutkreislauf. Der Durchtritt durch die HEVs wird vor allem durch L-Selektin (CD62L) (Ahmadzadeh et al., 2001) auf den T-Zellen und dessen Ligand PNA_d (peripheral node addressin) auf den HEVs vermittelt (Berg et al., 1991). Für eine vollständige Zirkulation benötigen die naiven T-Zellen etwa 12 bis 18 h (Sprent, 1973).

In der Peripherie überleben naive T-Zellen mehrere Monate (in Maus und Ratte) bis hin zu einigen Jahren (im Menschen), dabei bleibt deren Anzahl, innerhalb enger Grenzen, konstant. Abgestorbene naive T-Zellen werden zum Teil durch im Thymus neu gebildete Zellen ersetzt. Die Homöostase wird zudem durch die Teilung naiver T-Zellen gewährleistet. Die Teilung naiver T-Zellen findet in geringem Umfang statt, es teilen sich weniger als 20 % der naiven T-Zellen in einem Zeitraum von fünf Wochen homöostatisch (Tough and Sprent, 1994). Die Homöostase gewährleistet, dass nicht zu viele T-Zellen am Leben gehalten werden müssen, jedoch ein ausreichend diverser Pool an naiven T-Zellen erhalten bleibt. Die T-Zellen müssen folglich proliferieren, wenn ihre Zahl zu gering wird, beziehungsweise nicht weiter expandieren, wenn sie in ausreichender Zahl vorhanden sind. Entsprechende Signale müssen also die homöostatische Proliferation der T-Zellen regulieren. Es hat sich gezeigt, dass sowohl Zytokine als auch TCR-Signale die Homöostase der T-Zellen beeinflussen.

So benötigen naive T-Zellen zum Überleben in der Peripherie MHC·Selbst-Peptid-TCR-Wechselwirkung. (Rooke et al., 1997; Takeda et al., 1996; Kirberg et al., 1997; Brocker, 1997; Witherden et al., 2000; Tanchot et al., 1997; Nesic and Vukmanovic, 1998; Labrecque et al., 2001). Die T-Zellen scheinen dabei um Bindungsstellen an MHC·Selbst-Peptid-Komplexen zu konkurrieren, was eine übermäßige Vermehrung einzelner T-Zellspezifitäten unterbindet und somit die Vielfalt der TCR-Spezifität

garantiert. So lässt sich beobachten, dass polyklonale naive T-Zellen beim Transfer in TCR-transgene Tiere homöostatisch proliferieren, dies ist beim Transfer in Wild-Typ-Mäuse nicht der Fall. Weiterhin inhibieren monoklonale, naive T-Zellen die Proliferation von T-Zellen gleicher Spezifität, während transgene naive T-Zellen unterschiedlicher Spezifität sich gegenseitig nicht beeinflussen (Troy and Shen, 2003). Entsprechend ließ sich zeigen, dass die Homöostase naiver T-Zellen von der Menge des vorhandenen Selbst-Peptids abhängt (Ge et al., 2001). Die Peptide, die dabei von den verschiedenen TCRs erkannt werden, sind vermutlich dieselben, auf die die T-Zellen bereits im Thymus positiv-selektioniert wurden (Kirberg et al., 1997; Tanchot et al., 1997; Boursalian and Bottomly, 1999; Viret et al., 1999). Versuche mit verschiedenen transgenen naiven CD4⁺-T-Zellen haben gezeigt, dass sowohl die TCR-Dichte, als auch die CD5-Expressionsrate, einem negativen Regulator des TCR-Signals, Einfluss auf die homöostatische Proliferation naiver T-Zellen haben (Kassiotis et al., 2003). Die Größe der gesamten, polyklonalen T-Zellpopulationen wird wahrscheinlich über Zytokine reguliert. Naive T-Zellen exprimieren große Mengen an IL-7R (Schluns et al., 2000). Experimente mit blockierenden IL-7- und IL-7R-Antikörpern, sowie mit IL-7^{-/-}- und IL-7R^{-/-}-Mäusen sowie mit IL-7-Injektionen zeigten, dass IL-7 ein limitierender Faktor der homöostatischen Proliferation naiver T-Zellen ist (Tan et al., 2001; Schluns et al., 2000; Goldrath et al., 2002; Maraskovsky et al., 1996).

1.5.5 TCR-Signaltransduktion

Die spezifische Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes durch den TCR-Komplex der T-Zelle führt zur Ansammlung mehrerer Rezeptoren und zur Phosphorylierung der ITAMs des TCR-Komplexes. Entsprechend dem in Abbildung 1.3 skizzierten Schema führt dies schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB (nuclear factor κB), NFAT (nuclear factor of activated T cells) und AP-1 (Activator protein 1) sowie zur Beeinflussung der Polarisierung und des Migrationsverhaltens der Zelle. Eine wichtige Rolle spielen neben den TCR-Signalen die Signale der kostimulatorischen Moleküle.

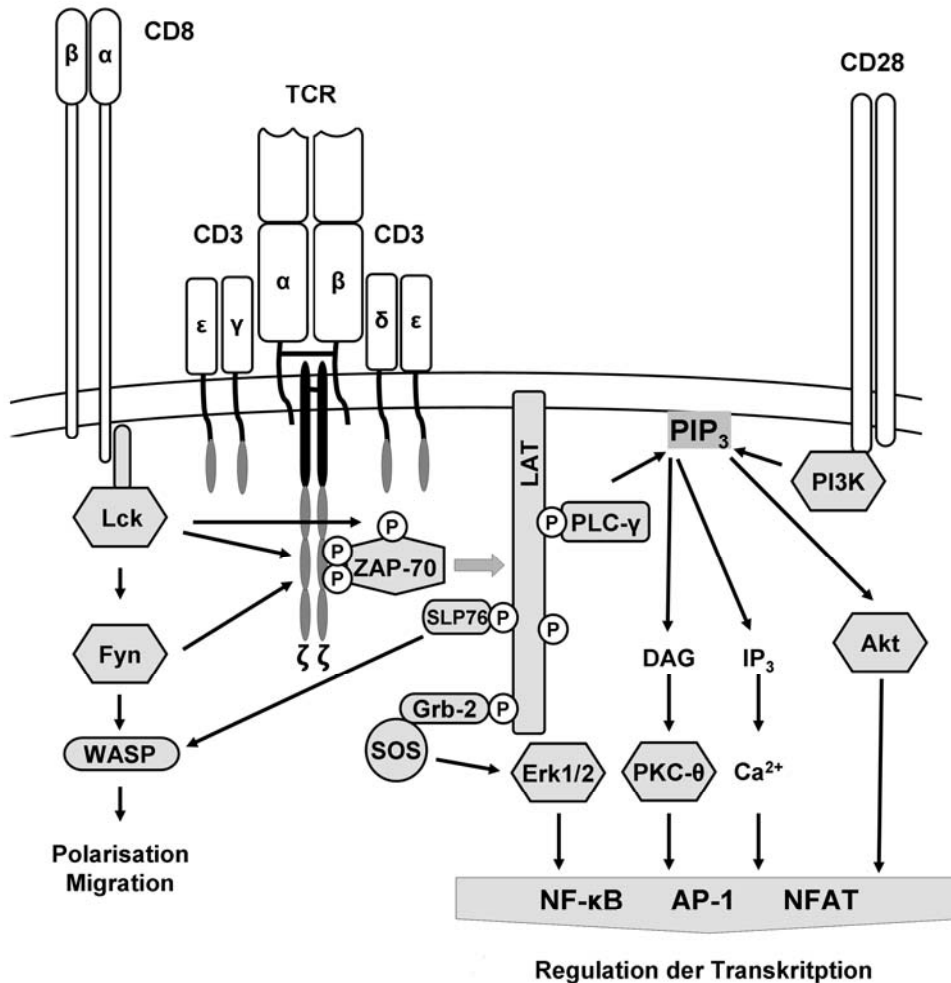


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der TCR-Signaltransduktion

Dargestellt ist die Signalweiterleitung bei Antigen-Erkennung des TCRs. Die Signaltransduktionskaskade wird durch die Bildung der immunologischen Synapse initiiert, es kommt zur Annäherung des an die Korezeptoren gebundenen Lck an die ITAMs, diese werden, ebenso wie die Kinase Fyn phosphoryliert. Die Phosphorylierung der ITAMs ermöglicht die Bindung von ZAP-70 (ζ -chain-associated protein kinase 70) was in der Phosphorylierung und damit Aktivierung des ZAP-70 Moleküls resultiert. Durch ZAP-70 wird LAT (linker for activation of T cells) phosphoryliert, was die Bindung weiterer Komponenten der Kette ermöglicht. Die Bindung von PLC- γ (Phospholipase C- γ) resultiert in der Spaltung von PIP₃ (Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat) in DAG (Diacylglycerol) und IP₃ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat), und entsprechend über die Aktivierung von PKC- θ (Protein Kinase C- θ), beziehungsweise die Freisetzung von Ca²⁺ zur Aktivierung von AP-1 (Activator protein 1) und NFAT (nuclear factor of activated T cells). Darüber hinaus assoziiert der Komplex aus Grb-2 (growth factor receptor-bound protein 2) und SOS (son of sevenless) mit LAT, was zur Aktivierung des MAP- (mitogen activated kinase) Kinaseweges und schließlich zur Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor κ B) führt. Somit reguliert das TCR-Signal direkt die Transkription. Diese wird zudem über Signale des CD28-Moleküls reguliert. Das Signal wird dabei über die PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) vermittelt. Die PI3K konvertiert zunächst PIP₃ in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, was über Akt schließlich zur Aktivierung von NFAT führt.

Neben der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wirkt das TCR-Signal auf Proteine der WASP- (Wiskott-Aldrich syndrome protein) Familie und damit auf die Polarisation und Migration der Zelle. Dieser Effekt wird über Fyn und SLP76 (SRC-homology-2domain-containing leukocyte protein of 76), welches direkt an LAT bindet vermittelt (Janeway et al., 2001; Cannons and Schwartzberg, 2004; Friedl et al., 2005; Weil and Israel, 2004).

1.5.6 Aktivierung von T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen lassen sich nur durch zwei gleichzeitig vermittelte Signale aktivieren. Neben dem spezifischen Signal über den TCR erfordert die T-Zell Aktivierung ein zweites, über kostimulatorische Moleküle vermitteltes, Signal. Dieses Signal kann nur von aktivierten, professionellen APCs geliefert werden. Die Aktivierung einer naiven CD8⁺-T-Zelle zur Effektorzelle erfolgt also ausschließlich durch Makrophagen und DCs. Die Aktivierung findet in der Regel in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten statt. Dazu wandern die aktivierten DCs beziehungsweise Makrophagen in den Lymphknoten ein und treffen dort auf die naiven T-Zellen. T-Zellen und DCs treten dabei in engen Kontakt miteinander, so dass Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Oberflächenmolekülen möglich sind. Die Expression des CC-Chemokinrezeptors 7 (CCR7) spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die beiden CCR7 Liganden, die Chemokine CCL19 und CCL21 werden von Stromazellen in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten sowie vom HEV-Endothel sezerniert (Gunn et al., 1998; Randolph et al., 2005). Die Expression von CCR7 auf naiven T-Zellen (Sallusto et al., 1999) und APCs (Jang et al., 2006) sorgt für die Kolokalisation von T-Zellen und APCs in den Lymphknoten und ermöglicht somit die Interaktion der beiden Zelltypen (Viola et al., 2006).

Präsentiert nun eine APC das für einen T-Zellklon spezifische Antigen, so bildet sich initial ein stabiler ternärer TCR·MHC·Peptid-Komplex. Daraus resultiert die Bildung der so genannten immunologischen Synapse (Lee et al., 2002). Hierbei findet im Zentrum der Synapse eine Ansammlung des TCR-Komplexes, des Korezeptors, des CD2- und des CD28-Moleküls statt. Im Bereich um das Zentrum finden sich große Mengen an LFA-1 (Monks et al., 1998; Grakoui et al., 1999; Krummel and Davis, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass nur zehn spezifische Antigen·MHC-Komplexe auf einer APC ausreichen um eine vollständige Aktivierung der T-Zelle zu vermitteln (Irvine et al., 2002). Es ist jedoch nicht klar, wie lange eine Interaktion zwischen APC und T-Zellen dauern muss, um in einer vollständigen Aktivierung der T-Zelle zu resultieren, verschiedene Publikationen geben hierfür Werte zwischen 2 und 24 Stunden an (Kaech and Ahmed, 2001; van Stipdonk et al., 2001; Huppa et al., 2003). Die Aktivierung der T-Zelle bewirkt zunächst die Produktion von autokrin wirkendem Interleukin-2 (IL-2). Die Wirkung des IL-2 wird durch die erhöhte Expression der IL-2R α -Kette (CD25) erhöht. Die α -Kette bildet zusammen mit den konstitutiv exprimierten, niederaffinen β - und γ -Ketten den hochaffinen IL-2 Rezeptor. Das IL-2

regt die Zelle über mehrere Tage hinweg zu zwei bis drei Zellteilungen pro Tag an. Etwa vier bis fünf Tage nach der Aktivierung entwickeln sich die Effektorzellen. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Zellen CTLA-4 (CTL activation associated protein 4) zu exprimieren. Dieses Protein hemmt die Aktivierung, indem es CD80/86 mit deutlich höherer Affinität als CD28 bindet, im Gegensatz zu diesem aber kein stimulatorisches Signal vermittelt.

Die entstandenen Effektorzellen unterscheiden sich durch verschiedene Oberflächenmarker von den naiven CD8⁺-T-Zellen. So können sie an der, durch proteolytische Spaltung induzierten, Reduktion der CD62L-Expression erkannt werden (Chao et al., 1997; Galkina et al., 2003; Smalley and Ley, 2005). Zudem erhöht sich die Expression von Aktivierungsmarkern. Hierbei zählen CD25 und CD69 zu den frühen Aktivierungsmarkern, sie werden bereits kurz nach der Aktivierung hochreguliert (Zimmermann et al., 1999). Dagegen steigt die CD44-Expression mit der Lebensdauer der Effektorzelle (Zimmerman et al., 1996). Darüber hinaus ist die TCR-Expression auf Effektorzellen im Vergleich zu naiven CD8⁺-T-Zellen leicht erniedrigt (Liu et al., 2000).

Neben der veränderten Expression der genannten Oberflächenantigene zeichnen sich die Effektorzellen dadurch aus, dass sie Perforin und Granzym B produzieren und in Granula speichern. Diese Proteine vermitteln, ebenso wie der Oberflächenmarker CD95L (FasL), die zytotoxische Funktion der CTLs. Modifikationen in der Signalmaschinerie (Kersh et al., 2003), sowie umfangreiche Veränderungen in der Genexpression (Kaech et al., 2002) unterscheiden die Effektor- von den naiven T-Zellen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Effektorzellen, im Vergleich zu naiven T-Zellen ein verändertes CpG-Methylierungsmuster im IL-2- und IFN- γ -Promotor aufweisen, sowie verstärkte Acetylierung der Histone im IFN- γ -Lokus zeigen (Northrop et al., 2006).

Das Wanderungsverhalten der T-Zellen ändert sich mit der Aktivierung drastisch, während die Wanderung der naiven T-Zellen darauf ausgerichtet ist, das Zusammentreffen mit APCs in den lymphatischen Organen zu gewährleisten, sollen aktivierte T-Zellen in peripheren Geweben auf potentielle Zielzellen treffen und ihre Effektorfunktionen ausüben. Wie bereits zuvor erwähnt macht sich dies in der reduzierten Expression des CD62L- und des CCR7-Moleküls bemerkbar, die Zellen wandern also nicht mehr in den Lymphknoten ein. Neuere Arbeiten zeigen, dass die entstandenen Effektorzellen einen sehr differenzierten Phänotyp aufweisen. Dieser

erlaubt eine genaue Steuerung der Wanderung der Zellen. So exprimieren zum Beispiel in den mesenterialen Lymphknoten aktivierte T-Zellen ein bestimmtes Muster an CCRs und Integrinen, die ihnen das Einwandern in die intestinalen Bereiche erlauben. Zur Zeit sind Wanderungsmarker für die Migration in intestinale Bereiche und in die Haut, zumindest im Mausmodell, ausführlich beschrieben (Dudda and Martin, 2004; Agace, 2006).

1.5.7 Funktion zytotoxischer T-Zellen

Die nach der Aktivierung und Proliferation naiver CD8⁺-T-Zellen entstandenen Effektorzellen sind bereit für die Eliminierung virusinfizierter beziehungsweise veränderter körpereigener Zellen. Bindet der TCR einen MHC I-Peptid-Komplex mit ausreichender Affinität wird die CTL durch Reorganisation des Zytoskelettes polarisiert und schüttet zielgerichtet zytotoxische Granula auf die Zielzelle aus. Die Granula enthalten neben Perforin, Granzymen und Fas-Ligand eine Vielzahl anderer Moleküle, die unter anderem als Chaperone dienen können.

Die Produktion der Effektormoleküle beginnt nach der vollständigen Aktivierung der T-Zellen. Die Moleküle werden in Granula im Zytosol gespeichert und stehen im Falle eines Kontaktes mit dem Antigen zur Verfügung, um die sofortige Eliminierung der Zielzelle zu vermitteln.

Die Effektorfunktionen können ohne Kostimulus aktiviert werden. Die bloße Präsentation des Peptid-MHC I-Komplexes reicht als alleiniges Signal aus. Es wird kein zweites Signal benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass zur Vermittlung der Effektorfunktion keine Immunologische Synapse gebildet wird (Purbhoo et al., 2004).

Die von der Effektorzelle ausgeschütteten Perforin-Moleküle binden zunächst auf der Oberfläche der Zielzelle und lagern sich als Homomultimere in die Membran ein. Die Multimere bilden eine Pore von bis zu 16 nm Durchmesser (Browne et al., 1999). Um sich selbst vor Perforin zu schützen, exprimieren CTLs ein Membranprotein, das mit Perforin wechselwirkt und die Porenbildung unterbindet (Muller and Tschopp, 1994). Bei dem ebenfalls ausgeschütteten Granzym B handelt es sich um eine Serinprotease, die sehr spezifisch Procaspasen (Darmon et al., 1995; Duan et al., 1996; Martin et al., 1996; Shi et al., 1996; Talanian et al., 1997; Yang et al., 1998) durch Spaltung aktiviert und somit Apoptose-Kaskaden in der Zielzelle auslöst. Darüber hinaus kann Granzym B CAD (caspase-activated DNase) durch Spaltung von ICAD (inhibitor of CAD) aktivieren (Thomas et al., 2000; Liu et al., 1997; Liu et al.,

1998; Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Weitere Beobachtungen zeigen, dass Granzym B auch über den mitochondrialen Weg (Freisetzung von Cytochrom c) Apoptose auslösen kann (Barry et al., 2000; Sutton et al., 2000; Heibin et al., 2000; Alimonti et al., 2001).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass das Granzym B durch die Perforin-Poren tritt um seine Funktion zu erfüllen (Duke et al., 1989). Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Poren den Durchtritt von Molekülen bis zu 8 kDa zulassen, während Granzym B, das zum Teil mit anderen Proteinen assoziiert, eine Größe zwischen 30 bis 65 kDa erreicht. Sofern diese Berechnungen stimmen muss das Granzym also auf anderem Wege in die Zielzelle gelangen. So könnten die Perforin-Poren reparative Endozytose auslösen, wodurch auch die Granzyme phagozytiert werden würden (Podack, 1999). Neben dem Perforin-Granzym-B-System kann die aktivierte CTL auch über das CD95 (Fas)–System Apoptose in der Zielzelle auslösen. Die CTL exprimiert dabei den Liganden des CD95 (CD95L beziehungsweise FasL), dieser bindet an CD95 auf der Oberfläche der Zielzelle und induziert über FADD (Fas activated death domain) und Caspase 8 die Apoptose (Medana et al., 2000; Suda et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992).

Eine weitere wichtige Funktion der aktivierten CTLs ist die Ausschüttung von IFN- γ . IFN- γ spielt eine wichtige Rolle im Zusammenspiel verschiedener Komponenten des Immunsystems. Es induziert, zusammen mit IL-12, die Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen zu Th1 und ist darüber hinaus essentiell für die Aktivierung von Makrophagen (Bradley et al., 1996). Die Einwanderung weiterer Zellen des Immunsystems an die Stelle der IFN- γ -Sekretion wird durch Veränderung der auf den Endothelzellen exprimierten Selektine, sowie durch Zytokin-Produktion des Endothels, beschleunigt. Weiterhin vermittelt IFN- γ Effekte, die für die Aktivierung und Funktion der CTLs entscheidend sind: IFN- γ induziert in APCs die Expression der CD28-Liganden CD80 und CD86 (Freedman et al., 1991; Hathcock et al., 1994), die zur Kostimulation der naiven CD8⁺-T-Zellen während der Aktivierung zu Effektorzellen benötigt werden.

Auch die Effektorfunktion der CTLs wird durch IFN- γ unterstützt. Es erhöht die MHC I-Dichte auf der Oberfläche der Zielzellen durch Erhöhung der Expression des β_2 -Mikroglobulins (Kimura et al., 1986). Neben der β_2 -Mikroglobulin-Expression unterliegen auch die Gene des TAP der IFN- γ -Regulation (Epperson et al., 1992), wodurch die Prozessierung der Antigene beschleunigt wird. Die Präsentation zellulärer Proteine wird also insgesamt intensiviert. Hierbei spielt auch die Wirkung

des IFN- γ auf das Proteasom eine entscheidende Rolle, da es die Expression der Immunoproteasom-Untereinheiten bewirkt (Boes et al., 1994).

1.5.8 T-Zellavidität

Die Stärke der Bindung zweier Moleküle wie zum Beispiel dem TCR und dem MHC-Peptid-Komplex wird über die Affinität definiert. Erfolgt eine Bindung über mehrere Einzelbindungen, wie z. B. zwischen CTL und APC, so reicht die Affinität zur Beschreibung der Bindung nicht aus. Die so genannte Avidität, die als Produkt aus der Affinität und der Anzahl der Bindungen definiert ist, wird deshalb zur Beschreibung multivalenter Bindungen herangezogen. Die Avidität kann sowohl durch die Änderung der Affinität der einzelnen Bindungen als auch durch die Änderung der Anzahl der beteiligten Bindungen beeinflusst werden.

Die Avidität der T-Zellen wird im Allgemeinen über die Funktionalität der Zellen definiert, und daher auch häufig als funktionelle Avidität bezeichnet. Hochavide T-Zellen reagieren bereits auf sehr geringe Mengen an Antigen, während niederavide T-Zellen höhere Peptidkonzentrationen benötigen, um aktiviert zu werden. Entsprechend lassen sich *in vitro* T-Zelllinien unterschiedlicher Avidität generieren, diese unterscheiden sich meist in der Affinität des TCR (Alexander-Miller, 2005). Neben dem Vergleich verschiedener *in vitro* etablierter T-Zelllinien unterschiedlicher TCR-Affinität besteht die Möglichkeit die Affinität und damit die Avidität der T-Zellen zu variieren indem man Peptide (so genannte „altered peptide ligands“) verwendet, die im Komplex mit dem entsprechenden MHC-Molekül den TCR mit unterschiedlicher Affinität binden (Auphan-Anezin and Schmitt-Verhulst, 2001; Auphan-Anezin et al., 2003). Unter Verwendung solcher Modelle konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass das Erreichen verschiedener Aktivierungszustände der T-Zellen von der Avidität abhängt, dass also das Erreichen einer bestimmten Signalstärke von Nöten ist um einen gewissen Grad an Funktionalität zu erreichen. So konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel die Regulation diverser Aktivierungsmarker, die Proliferation und die Induktion der IL-2-Produktion während der Aktivierung, sowie die Produktion von IFN- γ und die Lyse von Zielzellen von der Avidität der T-Zellen abhängen (Auphan-Anezin and Schmitt-Verhulst, 2001; Auphan-Anezin et al., 2003; Faroudi et al., 2003; Labrecque et al., 2001; Valitutti et al., 1995; Valitutti et al., 1996).

Im Gegensatz zu den Modellen bei denen die Affinität des Rezeptors variiert wird etablierten Labrecque et al. ein Modell bei dem sich die Anzahl der transgenen Rezeptoren auf naiven CD8⁺-T-Zellen durch die Gabe von Tetracyclin modulieren lässt. Dieses Modell erlaubt also die Variation der Avidität durch die Veränderung der Anzahl der Rezeptoren, bei gleich bleibender Rezeptoraffinität. Hier konnte gezeigt werden, dass auch bei diesem Ansatz das Erreichen bestimmter Signalstärken die Funktionen der T-Zellen beeinflusste (Labrecque et al., 2001). Die entsprechenden Beobachtungen konnten in einem Modell unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Das St40/St42-Modell besteht aus zwei T-Zellklonen, die denselben TCR in unterschiedlicher Dichte exprimieren. Die unterschiedliche TCR-Dichte resultiere dabei in großen Unterschieden bei der Aktivierung der T-Zellen. So zeigten die niederaviden T-Zellen deutlich reduzierte Proliferationsraten, sowie verlangsamte Regulation der Aktivierungsmarker. Im Gegensatz dazu zeigten die entsprechenden Effektorzellen keine Unterschiede bezüglich der spezifischen Lyse Peptid-beladener Zielzellen. Bei der Analyse der Produktion der Zytokine IL-2 und IFN- γ zeigte sich jedoch, entsprechend der Beobachtungen anderer Gruppen, dass die niederaviden T-Zellen bei Peptid-Restimulation keines der beiden Zytokine sezernierten. Zudem erlaubte die Verwendung eines mutierten Peptids die Analyse der Bedingungen unter veränderter Rezeptor-Affinität. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die IFN- γ -Produktion bei niedrigerer Avidität deutlich reduziert war, während die spezifische Lyse Peptid-beladener Zellen nicht beeinflusst wurde (Hofmann et al., 2004). Die Avidität der T-Zellen beeinflusst also die Aktivierung der T-Zellen sowie deren Effektorfunktionen.

1.5.9 T-Zell-Kompetition

Obwohl ein in den Körper eingedrungener Erreger eine Vielzahl verschiedener Antigene mit sich bringt, ist die T-Zellantwort stets auf einige wenige, so genannte immunodominante Antigene begrenzt (Kedzierska et al., 2005; Yewdell and Bennink, 1999; Zinkernagel and Doherty, 1979). Diese Immunodominanz ist auf verschiedene Effekte zurückzuführen. Es kommen Unterschiede bei der Expression der Antigene, in der Antigenprozessierung und schließlich der Antigenpräsentation zum Tragen (Chen et al., 2000; Deng et al., 1997; Eisenlohr et al., 1992; La Gruta et al., 2006; Sette et al., 1994; Yewdell and Bennink, 1999). Genauere Analysen legten die Vermutung nahe, dass diese Effekte nicht die alleinigen, die Immunodominanz

verursachenden, Faktoren sind. Die Konkurrenz verschiedener T-Zellklone untereinander könnte ebenso Einfluss auf die Form der entstehenden Antwort haben (Grufman et al., 1999b; Grufman et al., 1999a; Wolpert et al., 1998). Weitere Indizien in dieser Richtung waren die Beobachtungen, dass mit wiederholten Infektionen die Avidität der Effektorzellen zunahm, dass sich also bei jeder Antwort jeweils die Zellen mit der höchsten Avidität gegen die Zellen niedrigerer Avidität durchzusetzen vermochten (Busch and Pamer, 1999; Rees et al., 1999; Savage et al., 1999). Schließlich konnten Kedl et al. zeigen, dass adoptiv-transferierte OT I-Zellen die endogene SIINFEKL-spezifische Antwort unterdrückten, dass die T-Zellen also um die APCs konkurrierten (Kedl et al., 2000). Weitere Studien dieser Arbeitsgruppe zeigten schließlich, dass hochaffine T-Zellen in der Lage sind, die MHC I-Peptid-Komplexe spezifisch von der Oberfläche der APCs zu entfernen, daraus ließ sich schlussfolgern, dass die hochaffinen T-Zellen die Menge des Antigens reduzieren und somit die Expansion der niederaviden T-Zellen unterbinden (Kedl et al., 2002).

Widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen lassen die Frage, ob T-Zellen unterschiedlicher Spezifität ebenfalls um APCs konkurrieren, offen (Kedl et al., 2000; Probst et al., 2003; Willis et al., 2006).

Bei allen bisher angewandten Modellen wurden unphysiologisch hohe Mengen an hochaffinen TCR-transgenen T-Zellen transferiert. So konnte weder der Einfluss der Avidität der T-Zellen noch der Einfluss der Vorläuferfrequenz der konkurrierenden T-Zellklone abgeschätzt werden. Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass die Menge der adoptiv-transferierten T-Zellen einen starken Einfluss auf das Ergebnis des jeweiligen Experiments haben kann (Marzo et al., 2005). Zudem ließen die entsprechenden Modelle keine Rückschlüsse auf die Funktion der in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen zu. Dieses Problem schränkt die Aussagekraft dieser Modelle massiv ein.

1.5.10 Zytotoxisches T-Zellgedächtnis

Nachdem eine Infektion erfolgreich beseitigt wurde, was im Durchschnitt zwischen sieben und zehn Tagen dauert, bleiben von der Effektorpopulation lediglich etwa fünf Prozent der Zellen erhalten. Die verbleibenden antigenspezifischen Zellen können über einen sehr langen Zeitraum hinweg in der Peripherie und im Blut-beziehungsweise Lymphkreislauf überleben. Treffen sie erneut auf Zellen, die ihr spezifisches Antigen präsentieren, können sie diese direkt beziehungsweise nach

kurzer Reaktivierungsphase eliminieren und somit eine erneute Infektion unterbinden. Das Immunsystem kann sich also an den entsprechenden Erreger „erinnern“, weshalb diese Zellen als Memory- oder Gedächtniszellen bezeichnet werden (Murali-Krishna et al., 1998). Im Falle einer erneuten Infektion tragen also Gedächtniszellen den Großteil der spezifischen Immunantwort, weil sie, im Gegensatz zu naiven T-Zellen, keinen Kostimulus zur Aktivierung benötigen und sehr viel schneller zu proliferieren beginnen (Cho et al., 1999; Rogers et al., 2000; Veiga-Fernandes et al., 2000). Sie stehen darüber hinaus in größerer Zahl derselben Spezifität zur Verfügung als naive T-Zellen. Das Zusammentreffen mit infizierten Zellen findet also schneller und häufiger statt, die Zellen stehen zudem in größerer Zahl zur klonalen Vermehrung bereit.

Allen Effektor- und Gedächtniszellen ist gemein, dass sie CD44 in großen Mengen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach der Effektorphase findet man ausschließlich CD44 hochexprimierende Gedächtniszellen, diese lassen sich phänotypisch in zwei Gruppen unterteilen: Effektorgedächtniszellen (T_{EM}) und Zellen des zentralen Gedächtnisses (T_{CM}) (Bachmann et al., 1997; Kundig et al., 1996; Kuhober et al., 1996). Die Zellen der beiden Populationen werden anhand der Expression der CD62L- und CCR7-Moleküle unterschieden. Diese Moleküle bestimmen die Verteilung der Zellen auf die Peripherie beziehungsweise den Blut- und Lymphkreislauf. Die Zellen des zentralen Gedächtnisses exprimieren, analog den naiven T-Zellen, CCR7 und CD62L. Sie zeigen also ein ähnliches Wanderungsverhalten und zirkulieren über die HEVs in Blut und Lymphe. Die Effektorgedächtniszellen sind dagegen eher in der Peripherie zu finden (Kuhober et al., 1996). Sie zeigen zytotoxische Aktivität und produzieren $IFN-\gamma$. Im Gegensatz dazu sind die Zellen des zentralen Gedächtnisses, entsprechend ihrer Funktion, in der Lage, IL-2 zu produzieren, sie zeigen allerdings keine zytotoxische Aktivität und produzieren kein $IFN-\gamma$ (Kuhober et al., 1996; Masopust et al., 2001; Reinhardt et al., 2001). Einige Studien legen die Vermutung nahe, dass sich die bisher bekannten Gedächtnispopulationen in weitere Subpopulationen aufspalten (Baars et al., 2005; de Bree et al., 2005).

Wie zuvor für die naiven T-Zellen beschrieben, kommt es auch bei den Gedächtniszellen zur regulierten homöostatischen Proliferation. Es konnte gezeigt werden, dass die Konkurrenz um Bindungsstellen an MHC-Selbst-Peptid-Komplexe für die Homöostase der T-Gedächtniszellen unerheblich ist. Umstritten bleibt

hingegen die Frage, ob die MHC-Selbst Peptid-TCR-Interaktionen an sich für das Überleben der T-Gedächtniszellen notwendig sind (Kassiotis et al., 2003; Kassiotis et al., 2002; Swain et al., 1999; Murali-Krishna et al., 1999). Experimente zur Relevanz von IL-7 bei der Homöostase von Gedächtnis-T-Zellen zeigen, dass IL-7 auch hier einen limitierenden Faktor der homöostatischen Proliferation darstellt (Tan et al., 2001; Schluns et al., 2000; Goldrath et al., 2002; Maraskovsky et al., 1996). Darüber hinaus lässt sich beobachten, dass die Homöostase der CD8⁺-Gedächtnis-Zellen entscheidend von IL-15 abhängt (Goldrath et al., 2002; Kieper et al., 2002; Becker et al., 2002; Tan et al., 2002; Ku et al., 2000). Hier kann ein Überschuss an IL-7 jedoch das IL-15 kompensieren (Kieper et al., 2002). CD4⁺-Gedächtnis-Zellen hingegen scheinen unabhängig von IL-7 und IL-15 homöostatisch zu proliferieren (Tan et al., 2002).

1.5.11 Entstehung des T-Zellgedächtnisses

Obwohl die beiden Gedächtnispopulationen (T_{EM} , T_{CM}) schon seit längerem bekannt sind (Tripp et al., 1995; Hamann et al., 1997), konnte der Ursprung der jeweiligen Populationen bisher nicht eindeutig geklärt werden. So ist zunächst nicht klar, ob die Gedächtniszellen aus der Effektorpopulation, oder parallel dazu entstehen (Opferman et al., 1999; Hu et al., 2001; Lauvau et al., 2001; Aichele et al., 1997; Wu et al., 2002; Lefrancois et al., 2003; Seder and Ahmed, 2003). Entsprechend werden auch verschiedene Modelle der Entstehung der beiden Gedächtnispopulationen diskutiert, so besteht die Möglichkeit, dass die T_{EM} -Zellen aus den T_{CM} -Zellen entstehen. Adoptiv-Transfer Experimente zeigten jedoch, dass aus T_{CM} -Zellen keine T_{EM} -Zellen entstehen (Marzo et al., 2005; Wherry et al., 2003). Dagegen konnte gezeigt werden, dass sich aus adoptiv transferierten T_{EM} -Zellen T_{CM} -Zellen entwickeln können (Bachmann et al., 2005; Bouneaud et al., 2005; Marzo et al., 2005; Wherry et al., 2003). Detaillierte Analysen legen jedoch die Annahme nahe, dass diese Beobachtungen durch den experimentellen Ansatz zustande kommen. Marzo et al. konnten zeigen, dass diese Beobachtungen nur nach dem Transfer großer Mengen transgener T-Zellen gemacht werden können. Werden jedoch nur wenige hundert transgene T-Zellen vor der Immunisierung transferiert, so entstehen Gedächtniszellen mit einem jeweils stabilen T_{CM} - beziehungsweise T_{EM} -Phänotyp, was die parallele Entstehung von T_{CM} - und T_{EM} -Gedächtniszellen nahe legt. Die Annahme das T_{CM} - und T_{EM} -Zellen jeweils direkt entstehen, sich die eine Population

also nicht aus der anderen entwickelt werden von Analysen des jeweiligen TCR-Repertoires gestützt (Bouneaud et al., 2005; Baron et al., 2003).

Unabhängig von der Frage, ob Gedächtniszellen aus Effektorzellen entstehen, stellt sich zudem die Frage, welche Zellen während der Aktivierung zu Gedächtniszellen werden, beziehungsweise welche Art von Gedächtniszelle entsteht. Hier kommen mehrere Szenarien in Frage. Neuere Ergebnisse lassen vermuten, dass sich bereits früh in der T-Zellantwort entscheidet, welche Zellen zu Gedächtniszellen differenzieren (Marzo et al., 2005; Kaech et al., 2003). Es lässt sich also annehmen, dass Faktoren während der Aktivierungsphase der T-Zellen Einfluss auf die Gedächtnisbildung haben. So die Avidität der T-Zellen als ausschlaggebende Größe in Frage: Hoch- beziehungsweise niederavide T-Zellen könnten zu Gedächtniszellen differenzieren (Busch and Pamer, 1999; Fasso et al., 2000; Savage et al., 1999; Kedl et al., 2002). Ebenso könnte der Zeitpunkt der Aktivierung, und dementsprechend auch der Aktivierungszustand der APCs und die Menge des vorhanden Antigens Einfluss auf die Differenzierung der Zellen haben (Williams et al., 2006). Darüber hinaus könnte die Auswahl der Gedächtniszellen rein stochastisch erfolgen (Blattman et al., 2000; Sourdive et al., 1998). Es ist also nicht klar, welche Faktoren die Entstehung der Gedächtnisantwort beeinflussen (Lefrancois and Marzo, 2006). Somit ergibt sich also auch keine Möglichkeit die Bildung einer Gedächtnisantwort gezielt zu beeinflussen.

Betrachtet man die Entstehung der CD8⁺-Gedächtnisantwort im Speziellen, so tritt hier das Problem der CD4-Hilfe auf. Es wurde gezeigt, dass zur Entstehung funktioneller CTL-Gedächtniszellen die Gegenwart von CD4⁺-Zellen essentiell ist. Während die primäre CTL-Antwort von der Gegenwart der CD4⁺-Zellen unabhängig ist, zeigen CTL-Gedächtniszellen aus CD4^{-/-}-Mäusen eine deutlich schlechtere Sekundärantwort als Zellen aus Wildtyp-Mäusen (Shedlock and Shen, 2003; Sun and Bevan, 2003). Die Gegenwart der CD4⁺-Zellen ist dabei allerdings lediglich während der primären Aktivierungsphase von Bedeutung. So zeigen in Wildtypmäusen aktivierte CTLs eine normale Sekundärantwort in CD4^{-/-}-Mäusen (Shedlock and Shen, 2003).

Die Interaktion der CD4- mit der CD8-Zelle ist nicht gänzlich geklärt. Die Tatsache, dass CD8⁺-T-Zellen kein MHC II exprimieren schließt eine direkte Interaktion der Zellen aus. Daher wird eine indirekte Interaktion über die APC angenommen, unabhängig davon, ob die CD4-Zelle dabei direkt auf die CD8-Zelle wirkt (Keene and

Forman, 1982) oder der Effekt über die APC vermittelt wird (Lafferty and Cunningham, 1975; Ridge et al., 1998). In jedem Fall spielt die Interaktion des CD40L auf der CD4-Zelle mit dem CD40-Molekül eine entscheidende Rolle (Noelle, 1996; Borrow et al., 1996; Grewal and Flavell, 1998). CD40 wird sowohl auf APCs (Banchereau et al., 1994), als auch auf CD8⁺-T-Zellen (Bourgeois et al., 2002) exprimiert. Es wurde gezeigt, dass sich die CD40L-CD40-Interaktion mit monoklonalen Antikörpern mimikrieren lässt (Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Mit diesem Modell lässt sich zudem beobachten, dass lediglich die Aktivierung der APCs mit dem Antikörper ausreicht, um CD8-T-Zellen zu aktivieren, also keine direkte Aktivierung der CD8-T-Zellen notwendig ist (Ridge et al., 1998). Allerdings fiel die induzierte Antwort, im Vergleich zur direkten Injektion des Antiköpers sehr viel schwächer aus, es lässt sich also eine direkte Wirkung des CD40L auf CD8-T-Zellen vermuten.

1.6 Mechanismen der Toleranz

Die wichtigste Leistung des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen. So wird zum einen die Bekämpfung von Pathogenen ermöglicht, auf der anderen Seite eine Schädigung des eigenen Körpers verhindert. Berücksichtigt man die Entstehung der antigenspezifischen Rezeptoren des adaptiven Immunsystems, so wird klar, dass mehrere Kontrollstellen nötig sind, um autoreaktive Antworten sicher zu verhindern. Das neutrale Verhalten des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen wird als Toleranz bezeichnet. Hierbei unterscheidet man neben der zentralen Toleranz die periphere Toleranz.

Die zentrale Toleranz resultiert aus den Selektionsvorgängen während der T-Zellentwicklung im Thymus. Es sollten also keine autoreaktiven T-Zellen in die Peripherie entlassen werden. Nachdem dieses System jedoch nicht absolut zuverlässig ist, beziehungsweise schwach selbstreaktive T-Zellen in die Peripherie entlassen werden um einen ausreichend diversen T-Zellpool, der die zuverlässige Erkennung von Pathogenen erlaubt, zu gewährleisten, müssen die Mechanismen der peripheren Toleranz die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen kontrollieren.

So werden Selbst-Antigene aufgrund sehr geringer Expressionsmengen oder der Expression in Bereichen, die den Zellen des Immunsystems nicht zugänglich sind (so genannte immunprivilegierte Stellen), einfach von den T-Zellen ignoriert. Kommt es

dagegen zur Erkennung eines Selbst-Antigens in der Peripherie, so besteht zum einen die Möglichkeit, dass die T-Zellen das Antigen erkennen, aber keinen adäquaten Kostimulus erhalten und so anerg, d.h. inaktiviert werden. Auf der anderen Seite können die T-Zellen durch große Mengen an präsentiertem Antigen überaktiviert werden und absterben.

Neben diesen sehr schlecht steuerbaren Toleranzmechanismen stellen die so genannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) den wohl wichtigsten und effektivsten Mechanismus der peripheren Toleranz dar. Die T_{reg} sind in der Lage die Aktivierung von $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen zu hemmen und somit die Induktion einer Autoimmunantwort zu unterdrücken, beziehungsweise abzuschwächen (Gershon and Kondo, 1971; Sakaguchi et al., 1995; Shevach et al., 1998).

Bei den meisten bisher beschriebenen T_{reg} handelt es sich um $\alpha\beta$ - $CD4^+$ -T-Zellen. Da über $\alpha\beta$ - $CD8^+$ - T_{reg} lediglich vereinzelte Berichte vorliegen (Shevach, 2006) beschränken sich die folgenden Beschreibungen auf die $CD4^+$ - T_{reg} .

Die T_{reg} -Population lässt sich, aufgrund der Abstammung der Zellen in zwei Gruppen unterteilen. So zirkulieren im naiven Organismus die natürlich vorkommenden T_{reg} . Sie entstehen im Thymus (Itoh et al., 1999; Seddon and Mason, 2000) und lassen sich anhand der konstitutiven Expression des CD25-Moleküls identifizieren, sie machen etwa zehn Prozent aller $CD4^+$ -T-Zellen in der Peripherie aus (Sakaguchi et al., 1995). Weitere Analysen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 essentiell für die Entstehung der T_{reg} ist (Hori et al., 2003) und nur etwa 90 % der T_{reg} CD25 hoch exprimieren (Fontenot et al., 2005). Zudem konnte GITR als weiterer Oberflächenmarker für natürlich vorkommende T_{reg} identifiziert werden (McHugh et al., 2002).

Neben den natürlich vorkommenden T_{reg} kennt man induzierte T_{reg} , diese entstehen aus naiven $CD4^+$ -T-Zellen in der Peripherie. Man unterscheidet dabei TGF- β -produzierende Th3-Zellen von IL-10-produzierenden Tr1-Zellen (Chen et al., 1994). Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden T_{reg} exprimieren nicht alle induzierten T_{reg} FoxP3, sie zeigen jedoch hohe CD25-Expression.

Während für Th3- und Tr1-Zellen bekannt ist dass die Suppression über TGF- β beziehungsweise IL-10 vermittelt wird gilt es den Mechanismus der Suppression durch die natürlich vorkommenden T_{reg} noch zu klären (von Boehmer, 2005). Bisher gilt lediglich als geklärt, dass die Hemmung nicht Antigen-spezifisch und von Zell-Zell-Kontakt abhängig ist, sie zeigt keine Abhängigkeit von TGF- β und IL-10

(Shevach, 2002; Asseman et al., 1999; Green et al., 2003; Piccirillo et al., 2002; Tang et al., 2004; Thornton and Shevach, 2000). Ob die Suppression der T_{reg} durch den direkten Kontakt mit den T-Zellen oder über die APC vermittelt wird ist nicht bekannt. Unabhängig vom Mechanismus der Suppression stellt sich auf der anderen Seite die Frage, wie die Suppression der T-Zellen durchbrochen werden kann, wie also in der Gegenwart regulatorischer T-Zellen die Aktivierung naiver T-Zellen möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* mit TLR-Liganden aktivierte APCs die Suppression durch T_{reg} brechen können (Pasare and Medzhitov, 2003; Warger et al., 2006). Es wurde zudem festgestellt, dass lösliche, von den APCs sezernierte Substanzen für die Brechung der Suppression ausreichen, hierbei spielt IL-6, zusammen mit weiteren, nicht identifizierten, löslichen Substanzen, eine essentielle Rolle (Pasare and Medzhitov, 2003).

1.7 Gezielte Initiierung adaptiver Immunantworten

Bei vielen Infektionskrankheiten besteht die Möglichkeit, mit einem therapeutischen Medikament zu behandeln. Diese Medikamente inhibieren das Wachstum und die Replikation des Erregers und erleichtern somit die Bekämpfung des Erregers durch das eigene Immunsystem. Die Medikamente (Alymova et al., 2005; Deeks, 2006) verhindern durch Enzyminhibierung die Vermehrung von Viren, Antibiotika verhindern entsprechend die Vermehrung von Bakterien. Offensichtlich bergen diese Medikamente das Problem, dass sie die weitere Verbreitung des Erregers nicht verhindern, zudem treten meist die jeweiligen Symptome auf. Die Medikamente verlieren schließlich durch die Mutation des jeweiligen Zielenzym nach und nach an Wirkung und sorgen zudem für die Selektion resistenter Stämme die sich jeglicher Therapie entziehen. Im September 2006 trat zum Beispiel ein Tuberkulose Stamm auf, der gegen alle vier normalerweise verwendeten Medikamente völlig resistent war und sich daher nicht behandeln ließ (<http://www.cdc.gov/nchstp/tb/default.htm>). Im Zusammenspiel mit einer HIV-Infektion kann das Auftreten solcher Stämme verheerende Folgen haben. Das Problem resistenter Varianten tritt auch bei Medikamenten gegen HIV (Turner and Wainberg, 2006) und Bakterien auf (Johnson et al., 2006; Rahal, 2006; Bonomo and Szabo, 2006; Quinn et al., 2006; Rice, 2006). Die Neuentwicklung Enzym-inhibierender Medikamente erfordert zunächst die Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Zielenzym. Die Entwicklung ist

also sehr teuer und zeitaufwendig (Biava et al., 2006; Power, 2006; Stebbing et al., 2005; Hsu et al., 2006; McNicholl and McNicholl, 2006; Luo et al., 1999; Wade, 1997). Dagegen haben einige Beispiele bereits bewiesen, dass Vakzinierungen eine sehr effektive Methode darstellen, um Infektionskrankheiten zu bekämpfen. Eine Vakzinierung verhindert im Idealfall bereits die Infektion durch einen Erreger, sodass es zu keinerlei Symptomen kommt. Dem Erreger wird durch eine flächendeckende Immunisierung zudem jeglicher Nährboden entzogen, er kann sich also nicht weiter ausbreiten und geht schließlich zugrunde. So wurde zum Beispiel durch die 1796 von Edward Jenner initiierte Vakzinierung gegen Pocken die vollständige Ausrottung des Erregers im Jahre 1980 möglich. Die Ausrottung des Polioerregers scheint zudem in Sichtweite. Es steht also außer Frage, dass die flächendeckende Impfung der Bevölkerung die vielversprechendste Methode ist, um einer Infektionskrankheit Herr zu werden.

Betrachtet man die aktuellen Impfprotokolle, so beruhen diese zum Großteil auf der Verwendung abgetöteter und attenuierter Erreger oder bestimmter Fragmente der Erreger. Dementsprechend wird eine adaptive Immunantwort induziert, die der Antwort nach einer Infektion mit dem jeweiligen Erreger ähnelt. Die Effektivität der Immunisierung ist von der Immunogenität des mit dem Erreger assoziierten PAMPs abhängig beziehungsweise liegt, durch die reduzierte oder komplett unterbundene Replikation des Erregers, unter Umständen deutlich unter der Effektivität einer echten Infektion.

Das Hauptproblem bei dieser Art der Immunisierung ist, dass für einige Infektionskrankheiten die Immunisierung mit abgetöteten und attenuierten Erregern, beziehungsweise deren Fragmente aufgrund des Auftretens von Revertanten sowie gefährlicher Nebenwirkungen nicht möglich ist, beziehungsweise die Erreger nicht immunogen genug sind um die Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems in adäquater Weise zu aktivieren. Auf diese Erreger sind die anderen Impfprotokolle also nur sehr bedingt übertragbar. Das gleiche Problem stellt sich auch bei der immunobiologischen Bekämpfung von Tumorerkrankungen. Hier sind nur körpereigene Zellen involviert, es kommt somit nicht zur Aktivierung des Immunsystems.

Zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems werden zwei Signale benötigt. Zum einen muss ein Zielantigen vorhanden sein, zum anderen wird ein aktivierendes Signal benötigt, welches den Zellen des nicht-adaptiven Systems erlaubt, die

spezifische Antwort zu induzieren. Ein modernes Vakzin sollte also die antigenen Komponenten eines Erregers oder Tumors mit immunogenen Komponenten kombinieren, diese sollten im Idealfall zudem die Art der induzierten Antworten beeinflussen. Es ließe sich dann nach dem Baukastenprinzip für jeden beliebigen Erreger beziehungsweise Tumor ein Impfcocktail zusammenstellen. Die hochkonservierten PRRs bergen dabei den Vorteil, dass sie in allen Patienten exprimiert werden und mittels synthetischer Liganden aktiviert werden können. Die antigenen Komponenten dagegen müssten bei Verwendung definierter Epitope an die HLA-Klassen des jeweiligen Patienten angeglichen werden, beziehungsweise weit genug gestreut sein, um eine entsprechend breites Spektrum an HLA-Typen abzudecken.

1.8 Zielsetzung

Im ersten Teil der hier beschriebenen Arbeit sollen zunächst die CD8⁺-T-Zellen zweier TCR-transgener Mausstämme näher charakterisiert werden. Die St42- und die St35-Mäuse sind transgen für denselben SGPSNTPPEI-H2-D^b-spezifischen TCR, exprimieren diesen aber in unterschiedlicher Menge auf ihrer Oberfläche. Mit diesem Modell soll der Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus soll das Modell zur Untersuchung der Konkurrenz von naiven zytotoxischen T-Zellen um Antigenpräsentierende Zellen verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll ein neues nicht-invasives, transkutanes Immunisierungsverfahren entwickelt und im Maus-Modell getestet werden. Dazu soll ein MHC I-Peptid zusammen mit einem TLR7-Liganden auf die Haut gegeben werden um eine systemische CD8⁺-T-Zellantwort zu induzieren. Darüber hinaus soll die Tumor-protective Kapazität der induzierten Antwort getestet, sowie der Einfluss regulatorischer T-Zellen bei der transkutanen Immunisierung evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

St35 C57BL/6-Hintergrund, transgen für D^b-SGPSNTPPEI spezifischen TCR, RAG2^{-/-}; CD90.2, CD45.1, mittlere TCR-Expression; überlassen Matthias Hofmann, Tübingen

St42 C57BL/6-Hintergrund, transgen für D^b-SGPSNTPPEI spezifischen TCR, RAG2^{-/-}; CD90.1, CD45.2, hohe TCR-Expression; überlassen von Rene Toes und Rienk Offringa, ULMC Leiden, NL (Toes et al., 1996)

C57BL/6 ZVTE Uni Mainz

RAG2^{-/-} C57BL/6-Hintergrund, RAG2-Knock-Out, Taconic (B6.SJL-ptprca/BoCrTac-[KO]RAG2 N10)

A- α C57BL/6-Hintergrund, MHC II-Knock-Out (Kontgen et al., 1993)

2.1.2 Zelllinien

EL4-Zelllinie Maus-Lymphom-Zelllinie; H2-D^b; H2-K^b; ATCC-NR: TIB-39

EG.7: EL-4 + pAc-neo-OVA-Plasmid; ATCC-NR: CRL-2113

2.1.3 Medien

Testmedium (TM)

Iscove`s Medium (DMEM); 5 % FCS; 1 % L-Glutamin; 1 % Natrium-Pyruvat; 1 % Penicillin/Streptomycin

DC-Medium

Iscove's Medium (DMEM); 5 % FCS; 1 % L-Glutamin; 1 % Natrium-Pyruvat; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % GM-CSF (Kulturüberstände)

T-Zellmedium (TZM)

Minimal essential medium (α MEM); 1 % Penicillin/Streptomycin; 50 μ M β -Mercaptoethanol; 10 % FCS; 1 % L-Glutamin; 1 % Natrium-Pyruvat

Selektionsmedium (SM)

TM 5; 1 mg/ml G418

2.1.4 Puffer

ACK-Puffer	150 mM NH ₄ Cl, 1 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA; pH 7,3
Bindungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O; pH 9,3
Blockierpuffer	1 % BSA; 0,05 % Tween 20 in PBS
Blutpuffer	30 mM EDTA; 0,1 % Na-Azid in PBS
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen
DNA-Ladepuffer	0,25 % (m/v) Bromphenolblau; 0,25 % (m/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin in ddH ₂ O
FACS-Puffer	1 % BSA, 0,02 % Natriumazid; 1 mM EDTA in PBS
Fix/Perm-Puffer	eBioscience
GM-Puffer	0,5 % BSA, 5 mM EDTA, 0,01 % Natriumazid in PBS
Ohr-Puffer	300 mM NaCl, 25 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0,2 % SDS
PBS (10x)	1,4 M NaCl; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ ; in ddH ₂ O pH7,2
Saponinpuffer	1 % BSA, 0,02 % Natriumazid, 0,1 % Saponin in PBS
Stopp-Lösung	2 M H ₂ SO ₄ ; in ddH ₂ O
Perm-Puffer	eBioscience
TAE (50x)	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
Trypanblaulösung:	0,5 % Trypanblau, 0,02 % Natriumazid in PBS
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in PBS

2.1.5 Antikörper

	Antigen	Klon	Markierung	Quelle
Durchfluss- zytometrie	B220	RA3-6B2	FITC	eBioscience
	CD2	RM2-5	PE	eBioscience
	CD3ε	145-2C11	APC	BD
	CD4	GK1.5	FITC	eBioscience
	CD4	RM4-5	PE	BD
	CD4	RM4-5	PE-Cy7	BD
	CD4	RM4-5	APC	BD
	CD4	GK1.5	APC	eBioscience
	CD5	53-7.3	PE	eBioscience
	CD8a	53-6.7	FITC	BD
	CD8a	53-6.7	PE	BD
	CD8a	53-6.7	PerCP	BD
	CD8a	53-6.7	APC	BD
	CD8a	53-6.7	APC-Cy7	BD
	CD11a	M17/4	PE	eBioscience
	CD16/32	2.4G2	---	BD
	CD24	M1/69	PE	eBioscience
	CD25	PC61	PE-Cy7	BD
	CD25	PC61	PerCP-Cy5.5	BD
	CD25	7D4	PE	BD
	CD28	37.51	PE	eBioscience
	CD44	IM7	APC	BD
	CD44	KM81	FITC	IT
	CD45.1	A20	FITC	eBioscience
	CD45.1	A20	PE	eBioscience
	CD45.1	A20	PE-Cy7	eBioscience
	CD45.2	104	FITC	eBioscience
	CD62L	MEL-14	APC	BD
	CD62L	MEL-14	PE	IT
	CD69	H1.2F3	PE-Cy7	BD
	CD90.1	OX-7	PerCP	BD
	CD90.1	HIS51	PE-Cy7	eBioscience
	CD90.1	HIS51	APC	eBioscience
	CD90.2	53-2.1	APC	eBioscience
	FoxP3	FJK-16s	PE	eBioscience
	FoxP3	FJK-16s	APC	eBioscience
	GITR	DTA-1	FITC	Hybridom
	H2-Db	28.14.8S	---	eBioscience
	IFN-γ	XMG1.2	APC	BD
	IgG1	A85-1	PE	BD
	IgG1	polyklonal	PE	Dianova
SIINFEKL-K ^b	25.D1.16	---	Hybridom	
TCRβ	H57-597	FITC	BD	

2. Material und Methoden

	TCR β TNP	H57-597 polyklonal	PE ---	eBioscience BD
<i>in vivo</i> Applikation	CD4 CD25 CD40	GK1.4 PC61 FGK-45	--- --- ---	Hybridom Hybridom Hybridom
ELISA	IFN- γ IFN- γ	R4-6A2 AN18.1724	--- Biotin	Hybridom Hybridom
MACS	CD8	53-6.7	Micro Beads	Miltenyi
T-Zell- Aktivierung	CD3 CD28	145-2c11 37.51	--- ---	Hybridom Hybridom

2.1.6 Reagenzien und Chemikalien

³ H-Thymidin	MP Biomedicals
⁵¹ Cr	(Na ₂ ⁵¹ CrO ₄), 5 μ Ci/ μ l, Hartman
Aldara-Creme	3M
Agarose	Promega
ASNENMETM-Peptid	Stefan Stevanovic, Tübingen
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Roth
Concanavalin A	Sigma
Glutamin	PAA
Glycerin	Roth
DimerX-K ^b /-D ^b	BD Biosciences
dNTPs	PeqLab
SGPSNTPPEI-Peptid	Stefan Stevanovic, Tübingen
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Roth
FCS	Vitromex
G418	PAA
GM-CSF	Kulturüberstände, Institut für Immunologie
H ₂ SO ₄	Merck
IFN- γ	rekombinant, BD

2. Material und Methoden

Ionomycin			Sigma
Iscove`s Medium (DMEM)			Invitromex
Isopropanol			Merck
Ketamin			Ratiopharm
L-Glutamin			Roth
Mercaptoethanol			Roth
Minimal essential medium (α MEM)			GIBCO
MgCl ₂			Promega
Na-Azid			Roth
NaCl			Roth
NaH ₂ PO ₄			Roth
Natriumpyruvat			Sigma
PCR-Puffer			10x, Promega
Penicillin/ Streptomycin			Serva
PI			Sigma
Primer			MWG-Biotech
Primer TCR	102		TCCACCATGAGCTGCAGGCTTCTCCTCTAT
	103		CGGCTTCTCAGCGCTCTGTTTATAACAGTAC
	104		TGTAATGAGAGGCACGTGGTTAAGCTCTCGG
PMA			Sigma
Proteinase K			Roche
Rompun			Bayer
Salbengrundlage			3M
Saponin			Sigma
Streptavidin-HRP			BD
Szintillationslösung			Roth
Taq-Polymerase			Promega
TMB			Sigma
Tris			Roth
Triton-X-100			Sigma
Trypanblau			Merck
Tween 20			Sigma
Xylencyanol			Sigma

2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

6-Kavitätenplatten (für BMDCs)	Greiner
6-Kavitätenplatten (für EL4, EG.7)	Falcon, BD
48- Kavitätenplatten	Greiner
96- Kavitätenplatten (U-Form + Flachboden)	Greiner
96- Kavitätenplatten - Maxisorb	Nunc
Abdeckplatten (steril)	Greiner
Cell Strainer	BD
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon, BD
FACS-Röhrchen 300 µl	Greiner
Kanülen	Braun
MACS-Säule	Miltenyi
Nescofilm	Roth
Reaktionsgefäße	Greiner
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss	Greiner
Pipettenspitzen	StarLab
Skalpelle	Paragon, Dahlhausen
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Omnifix
Zellkulturflaschen	Greiner

2.1.8 Verwendete Geräte

Analysenwaage	AE100, Mettler
α-Zähler	LKB 1205, Wallac
β-Zähler	TopCount NXT Microplate Counter, Packard
Cell-Harvester	LKB 1295-001, Wallac
Durchflusszytometer	FACSCanto, BD
ELISA-Photometer	Spectra Fluor Plus, Tecan
Feinwaage	PM2000, Mettler
Gelkammer	BioRad
Geldokumentation	BioRad
Inkubator	Hera cell 150, Heraeus
MACS-Magnet	Miltenyi
Maus-Halterung	Kent Scientific
Mehrkanal-Pipetten	Eppendorf

Langhaarschneider	ER121, Panasonic
Lichtmikroskop	DMIL, Leica
PCR-Cycler	Sprint, Hybaid
pH-Meter	765 Calimatic, Knick
Pipetten	Pipetman, Gilson
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Biosciences
Rasierer	Interface Excel 3773, Brau
Spannungsquelle	EPS 200, Pharmacia
Sterilbank	Hera safe, Hereaus
Tischkühlzentrifuge	Multifuge 3L-R, Hereaus
Tischzentrifugen	Biofuge pico, Heraeus
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, Assistant

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

2.2.1.1 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie erlaubt die schnelle Fluoreszenz-Messung einzelner Partikel. Die Methode beruht auf der Auftrennung eines dünnen Suspensionsstrahls in einzelne Tropfen. Jeder Tropfen enthält nur einen Partikel, dieser kann somit separat vermessen werden. Zur Messung wird der Tropfen mit Lasern bestrahlt. Diese erlaubt zum einen anhand der Abschirmung des Laserstrahls (Messung im Forward Scatter), die Größe, sowie, anhand der Streuung des Laserstrahls (Messung im Side Scatter), die Granularität des Partikels zu bestimmen. Zum anderen werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch das Laserlicht angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlängen, somit kann die Menge des jeweils vorhandenen Farbstoffes gemessen werden. Durch Verwendung mehrerer Anregungswellenlängen und verschiedener Filter zur Analyse des emittierten Lichtes lassen sich bis zu zwölf Fluoreszenzen gleichzeitig messen.

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt in der Regel mit fluoreszenz-markierten Antikörpern, prinzipiell ist jedoch die Messung beliebiger Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Bei der Analyse der Daten greift man im Allgemeinen auf zwei verschiedene Darstellungen zurück. So kann zum einen die Anzahl der jeweils gemessenen

Signale gegen die Signalstärke in einem so genannten Histogramm dargestellt werden, zum anderen wird die jeweilige Signalstärke zweier Kanäle für die einzelnen Partikel gegeneinander in einem so genannten Dotplot dargestellt (vergleiche Abbildung 2.1). Da die übersichtliche Darstellung auf zwei Dimensionen begrenzt ist, wird sich dadurch beholfen, dass Subpopulationen mit bestimmten Signalen separat in einem weiteren Diagrammen auf die weiteren Fluoreszenzen analysiert werden, die Subpopulationen werden dabei über so genannte „Gates“ definiert (beispielhaft in Abb. 2.1 dargestellt). Üblicherweise wird neben der optischen Darstellung der Anteil einer Subpopulation an Zellen, beziehungsweise die Stärke eines Fluoreszenzsignals auf einer Zellart angegeben. Die Signalstärke wird dabei als das mittlere Signal aller gemessenen Partikel in MFI („mean fluorescence intensity“) angegeben. Im Falle einer Antikörperfärbung repräsentiert die Signalstärke die Menge des vorhandenen Antigens. Um den Anteil der unspezifischen Bindung des Antikörpers abzuschätzen wird eine so genannte Isotyp-Kontrolle herangezogen, hier wird mit einem nicht spezifischen, zum entsprechenden Antikörper isotypen Antikörper gefärbt. Die erhaltene Signalstärke gibt den Hintergrund des Signals an und kann von diesem zur Berechnung des spezifischen Signals, das in SFI („specific fluorescence Intensity“) gegeben wird, herangezogen werden.

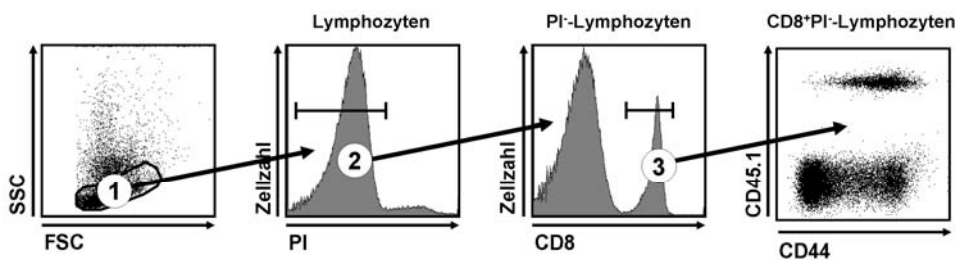


Abbildung 2.1: Exemplarische Darstellung einer 6-dimensionalen durchflusszytometrischen Analyse

Dargestellt ist die schrittweise Analyse CD8⁺PI⁻-Lymphozyten, dabei wird zunächst anhand der Größe und Granularität (aufgetragen in einem Dotplot) der Zellen die Lymphozyten-Population (1) definiert, aus dieser Population werden die für das PI-Signal (aufgetragen in einem Histogramm) negativen Zellen (2) auf die CD8-Expression (3) hin analysiert. Schließlich kann die Expression der Antigene CD45.1 und CD44 auf den CD8⁺PI⁻-Lymphozyten gegeneinander aufgetragen werden.

Durchführung

Die zu analysierenden Zellen werden 2-mal mit FACS-Puffer gewaschen. Pro Färbeansatz werden zwischen 200.000 und 2.000.000 Zellen verwendet. Die Zellen werden in eine Kavität einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte pipettiert. Die gewaschenen Zellen werden für 30 Minuten in 50 µl Antikörperlösung (FACS-Puffer) unter Lichtschutz auf Eis inkubiert. Vor der Messung werden die Zellen 3-mal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Kurz vor der Messung kann der Zellsuspension 1 µl Propidiumiodid-Lösung zugegeben werden, um tote Zellen anzufärben.

2.2.1.2 ELISA

Prinzip

Der ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) gehört zu den immunologischen Standardmethoden. Er beruht auf der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung und erlaubt die Bestimmung der Konzentration eines Antigens, beziehungsweise eines Antikörpers. Diese Methode wird in der Regel in 96-Kavitätenplatten durchgeführt, deren Kavitäten dabei als Reaktionsgefäß und Küvette dienen. Im klassischen ELISA werden die Kavitäten mit Antigen überzogen, anschließend wird unspezifische Proteinbindung durch Zugabe großer Mengen Protein unterbunden. Das Antigen bindet daraufhin spezifisch den zugegebenen Antikörper. Der Antikörper kann direkt an ein Enzym (Phosphatase oder Oxidase) gekoppelt sein und so die Detektion über eine enzymatische Farbreaktion erlauben. Weitaus häufiger findet jedoch eine indirekte Detektion statt, indem ein sekundärer, enzymgekoppelter Antikörper zugegeben wird. Beim so genannten Sandwich-ELISA werden die Kavitäten zunächst mit einem ersten Antikörper beladen, der das zu bestimmende Antigen bindet. Ein zweiter Antikörper bindet dann an das, durch den ersten Antikörper fixierte Antigen. Beide Antikörper müssen unterschiedliche Epitope auf dem Antigen erkennen, sonst wäre die Bindung des zweiten Antikörpers nicht möglich. Bei dieser Methode wird das Antigen im ersten Schritt konzentriert, es können also niedrigere Antigenkonzentrationen nachgewiesen werden.

Durchführung

Maxisorb-96-Kavitätenplatten werden zunächst mit einem unmarkierten α -Maus-IFN- γ Antikörper beschichtet. Hierzu wird der Antikörper zu 1 µg/ml in Bindungspuffer verdünnt und je 50 µl pro Kavität in die Platte pipettiert. Die Platte wird mit Nescofilm versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um unspezifische Bindung zu

minimieren wird am nächsten Tag die Antikörperlösung verworfen und die Platte mit 200 µl Blockierpuffer pro Kavität 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird die Platte mit Waschpuffer (200 µl pro Kavität) 3-mal gewaschen und mit je 100 µl Probe- beziehungsweise Standardlösung 2 h bei RT inkubiert. Die Überstände des ELISA-Ansatzes werden mit Blockierlösung 1:3 beziehungsweise 1:10 verdünnt. Als Standardlösung dient in Blockierpuffer verdünntes, rekombinantes Maus IFN- γ . Durch 1:2 Verdünnungsschritte wird eine Standardgerade von 8 ng/ml bis 8 pg/ml erzeugt. Es wird 4-mal gewaschen und 1 h bei RT mit biotinyliertem α -Maus-IFN- γ Antikörper inkubiert. Der Antikörper wird in Blockierpuffer zu 0,5 µg/ml verdünnt, pro Kavität werden 100 µl Antikörperlösung zugegeben. Nach 3-maligem waschen wird für 30 min bei RT mit Streptavidin gekoppelter Meerrettichperoxidase (1:1000 in Blockierpuffer verdünnt; 100 µl pro Kavität) inkubiert. Nach 5-maligem Waschen werden pro Kavität 100 µl TMB zugegeben. Nach etwa 15 min wird die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl 2 M H₂SO₄ pro Kavität gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen.

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeines

Alle hier behandelten Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, alle Arbeitsschritte wurden entsprechend unter der Sterilbank beziehungsweise in geschlossenen Gefäßen

durchgeführt. Die verwendeten Geräte wurden entweder mit 70 % Ethanol oder über der Flamme sterilisiert, beziehungsweise vor der Verwendung autoklaviert oder durch Gamma-Bestrahlung sterilisiert.

Zellen werden für 3 Minuten bei 600 x g zentrifugiert.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wird nach Anfärben mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellzahl errechnet sich nach:

Zellen/ml = gezählte Zellen pro großem Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴

2.2.2.3 Kultur der Tumorzelllinien EL4 und EG.7

EL4 und EG.7 werden in 6-Kavitätenplatten beziehungsweise in 125 mm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen werden etwa jeden 3. Tag passagiert und dabei etwa um den Faktor 1:10 verdünnt.

EL4-Zellen werden in Testmedium (TM), EG.7-Zellen in Selektionsmedium (SM) kultiviert.

Die EG.7-Zellen werden regelmäßig auf die Expression des OVA-Tragens untersucht. Dazu werden die Zellen zunächst mit einem nicht markierten Antikörper gegen SIINFEKL-H2-K^b und anschließend mit einem PE-markierten α -Maus-IgG1-Antikörper gefärbt und nach Zugabe von PI durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.2.4 Differenzierung und Aktivierung von BMDCs

Prinzip

Die Dendritischen Zellen werden *in vitro* im Rahmen eines mehrtägigen Reifungsprozesses aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks generiert. Dazu werden die Stammzellen direkt aus den Knochen der Hinterbeine (Femor und Tibia) der Tiere entnommen und mit GM-CSF ausdifferenziert. Nach 6 Tagen können unreife BMDCs geerntet werden. Während der Reifung werden unerwünschte Zellen durch abspülen nicht-adhärenter Zellen am zweiten Tag entfernt, stark adherente Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, bleiben bei der Ernte an Tag 6 auf der Oberfläche des Kulturgefäßes zurück. So werden etwa 70 bis 80 % reine BMDCs erhalten. Die ausdifferenzierten, unreifen BMDCs exprimieren CD11c und zeichnen sich durch niedrige Expression von Aktivierungsmarkern wie zum Beispiel CD40, OX40L, CD70, CD80 und CD86 aus. Die Zellen können durch Inkubation mit TLR-Liganden oder anderen Agenzien aktiviert werden und somit, nach Peptid-Beladung, zur Immunisierung von Mäusen oder für *in vitro* Experimente verwendet werden.

Durchführung

Zur Entnahme der Knochen werden die Mäuse durch CO₂ oder cervikale Dislokation getötet. Die Knochen werden von allen Sehnen, Muskeln und Bindegewebe gesäubert und mit PBS abgespült. Anschließend werden beide Enden eines Knochens mit einer sterilen Schere abgetrennt und das Knochenmark mit einer Spritze (100 Sterican Größe 18-Kanüle) mit 37 °C warmem TM ausgespült und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Zellen werden gezählt und zu je 4x10⁶ Zellen in 4 ml BMDC-Medium pro Kavität in eine 6-Kavitätenplatte gegeben (Tag 0).

An Tag 2 werden die nicht-adherenten Zellen vorsichtig mit dem überstehenden Medium suspendiert und abgenommen. Den adherenten Zellen werden wieder 4 ml 37 °C warmes BMDC-Medium zugesetzt. An Tag 4 werden vorsichtig 3 ml des überstehenden Mediums abgenommen und durch frisches 37 °C warmes BMDC-Medium ersetzt.

An Tag 6 können die ausdifferenzierten, unreifen BMDCs durch vorsichtiges Spülen geerntet werden. Zur Aktivierung mit p(I:C) werden die Zellen zu je 3×10^6 Zellen in 3 ml TM pro Kavität in eine 6-Kavitätenplatte gegeben und mit 50 µg/ml p(I:C) für 16 Stunden inkubiert. Die Zellen werden anschließend durch vorsichtiges Spülen geerntet und können zur Aktivierung von T-Zellen mit Peptid beladen werden. Dazu werden die Zellen zu 1×10^6 Zellen/ml in TM resuspendiert und mit der entsprechenden Konzentration an Peptid für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden für *in vitro* Experimente anschließend 2-mal in TM gewaschen und in TZM resuspendiert. Sollen die Zellen injiziert werden wird 2-mal mit PBS gewaschen, die Zellen werden dann in PBS resuspendiert.

2.2.2.5 *In vitro* Kultur zytotoxischer T-Zellen

CD8⁺-T-Zellen lassen sich *in vitro* stimulieren, was zur Proliferation der Zellen und zur Akquisition der Effektorfunktionen führen kann. Eine Aktivierung der T-Zellen mit MHC·Peptid-Komplexen funktioniert nur mit naiven transgenen T-Zellen oder mit isolierten zuvor *in vivo* aktivierten und expandierten Effektor- beziehungsweise Gedächtniszellen aus Wild-Typ-Mäusen. Eine Antigen-spezifische Aktivierung naiver Wild-Typ-T-Zellen mit Peptid-beladenen APCs gelingt nicht, da die Vorläuferfrequenzen der spezifischen Zellen zu niedrig sind. In diesen Fällen muss auf die Aktivierung mit Mitogenen wie zum Beispiel PMA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 zurückgegriffen werden. Die Aktivierung lässt sich am Einfachsten anhand der Proliferation der Zellen verfolgen. Um die Bedingungen der Experimente möglichst konstant zu halten sollten die Zellen zunächst aufgereinigt werden.

2.2.2.6 Anreinigung CD8⁺-T-Zellen durch MACS

Prinzip

Die MACS- („magnetically assisted cell sorting“) Methode beruht auf der spezifischen Antikörper-vermittelten Markierung von Zellen mit magnetischen Partikeln (etwa 50 nm Durchmesser). Diese binden an die Zellen und halten diese, im Magnetfeld, in einer mit Stahlwolle gefüllten Säule zurück, während nicht markierte Zellen die Säule

ungehindert passieren können. Die nicht markierten Zellen können problemlos von der Säule gewaschen werden. Wird die Säule anschließend aus dem Magnetfeld genommen lassen sich die markierten Zellen in hoher Reinheit eluieren.

Durchführung

Milzzellen werden zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet (siehe unten) und in GM-Puffer bei einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml mit direkt an magnetisch Partikeln gekoppeltem CD8-Antikörper (Verdünnung 1/400) für 30 Minuten unter gleichmäßigem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Zellen werden 2-mal mit GM-Puffer gewaschen, zu 1×10^8 Zellen/ml resuspendiert und auf eine zuvor mit GM-Puffer äquilibrierte MACS-Säule im Magnetfeld gegeben. Die Säule wird 2-mal mit GM-Puffer (je 5 ml) gewaschen, bevor die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die Zellen mit 5 ml GM-Puffer eluiert werden. Mit einem Reinigungsschritt wird in der Regel ein Anteil von mehr als 90 % an CD8⁺-Zellen erreicht. Die Zellen lassen sich direkt weiterverwenden.

2.2.2.7 *In vitro* Aktivierung transgener T-Zellen

Bei der *in vitro* Aktivierung der transgenen T-Zellen zur anschließenden Analyse der erhaltenen Effektorzellen werden je 50.000 T-Zellen in 48-Kavitätenplatten mit 25.000 Peptid-beladenen (100 nM) BMDC in 1 ml TZM für 3 Tage inkubiert. Anschließend werden die T-Zellen für die funktionellen Tests geerntet.

2.2.2.8 CFSE-Markierung und CFSE-Proliferationstest

Prinzip

Mit CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) lassen sich Zellen lang anhaltend fluoreszenz-markieren. Das CFSE liegt zunächst als Ester vor und kann so die Zellmembran passieren. Im Zytosol wird die Estergruppe durch Esterasen verseift, so dass der Farbstoff in der Zelle zurück gehalten wird. Die Succinimid-Gruppe ist sehr reaktiv, der Farbstoff bindet darüber kovalent an Lysin-Reste und andere freie Amin-Gruppen intrazellulärer Proteine. Da das CFSE bei Zellteilungen zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird, lässt sich die Proliferation einer Zellpopulation anhand veränderter CFSE-Markierung verfolgen (siehe Abbildung 2.2). Bis zu 10 Zellteilungen können auf diese Weise verfolgt werden (Parish, 1999).

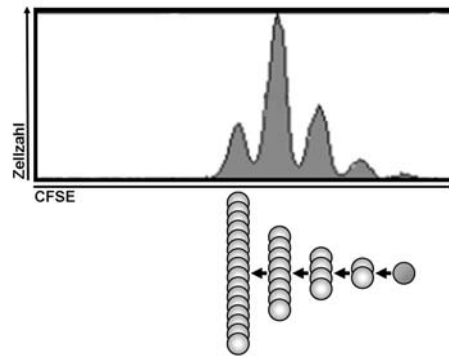


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Prinzips des CFSE-Proliferationstests.

Dargestellt ist das CFSE-Signal proliferierender T-Zellen. Die Proliferation korreliert mit einer schrittweisen Abschwächung des CFSE-Signals. Diese beruht auf der gleichmäßigen Verteilung des CFSEs auf die jeweiligen Tochter Zellen.

Durchführung

Zur Markierung der Zellen mit CFSE werden diese zunächst in PBS zu 2×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wird in einem 1:1 Verhältnis mit einer 5 μ M CFSE-Lösung (in PBS, kurz zuvor aus 10 mM Stammlösung in DMSO verdünnt) gemischt. Beide Lösungen werden zuvor auf 37 °C temperiert und nach dem Mischen unter gelegentlichem Umschwenken für 4 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Mischung werden, zum Abstoppen der Reaktion, 20 Volumenprozent FCS zugesetzt und die Zellen sofort abzentrifugiert. Die Zellen werden 2-mal mit TM gewaschen und können direkt im Proliferationstest eingesetzt werden.

Bei der Aktivierung in 96-Kavitätenplatten werden 25.000 T-Zellen pro Kavität ausgesät. Bei Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 werden die Kavitäten über Nacht mit den Antikörpern (je 0,5 μ g in 50 μ l PBS) bei 4 °C inkubiert. Die Kavitäten werden vor dem Aussäen der Zellen 2-mal mit PBS gewaschen.

Bei Stimulation mit PMA und Ionomycin werden dem Medium 25 ng/ml PMA und 0,5 μ M Ionomycin zugesetzt.

Findet die Aktivierung mit APCs in 48-Kavitätenplatten statt werden je 50.000 T-Zellen pro Kavität ausgesät und 25.000 beziehungsweise die angegebenen Mengen an Peptid-beladenen BMDCs zugesetzt.

Die Zellen werden jeweils bei 37 °C und 5 % CO₂ in 200 μ l beziehungsweise 1 ml TZM inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten werden Proben zur durchflusszytometrischen Analyse entnommen.

2.2.2.9 [³H]-Thymidin-Proliferationstest

Prinzip

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Zellproliferation bietet die Messung des von den Zellen eingebauten Tritium-markierten Thymidins. Hierzu werden die Zellen in [³H]-Thymidin-haltigem Medium inkubiert und anschließend die Markierung der Zellen bestimmt. Zur Detektion des Tritiums wird der Ansatz auf eine Glasfasermatte gesaugt. Auf dieser wird die DNA zurückgehalten und die Radioaktivität kann, nach Zugabe einer Szintillationsflüssigkeit, gemessen werden.

Durchführung

Thymidin-Einbautests werden in 96-Kavitäten-Flachbodenplatten in TZM ($V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l/Kavität}$) durchgeführt. Pro Kavität werden 25.000 T-Zellen ausgesät. Den T-Zellen werden die angegebenen Mengen an APCs zugesetzt und die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden werden 20 μl [³H]-Thymidin (1 μCi pro Kavität) enthaltendes TZM pro Kavität zugegeben, und die Platte für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Platte wird zunächst bei -20 °C eingefroren. Zum Auszählen der [³H]-Thymidin-Aufnahme lässt man die Platte bei Raumtemperatur auftauen. Die Zellen werden dann, mittels eines Cell-Harvesters auf eine Glasfasermatte gesaugt. Die Matte wird in einer Mikrowelle getrocknet, mit Szintillationsflüssigkeit inkubiert und im Counter ausgezählt.

2.2.3 Analysen zytotoxischer T-Zellen

2.2.3.1 DimerX-Färbung

Prinzip

Nachdem für T-Zellen viele Oberflächenantigene bekannt sind die Aussagen über den Status der Zellen geben, können durchflusszytometrische Analysen auf die Expression von Aktivierungsmarkern, neben der Größe der jeweiligen Population, wertvolle Informationen über die T-Zellen geben. Neben der einfachen Antikörperfärbung (Durchführung oben beschrieben) stellen MHC·Peptid-Multimere ein wichtiges Werkzeug in der durchflusszytometrischen T-Zellanalyse dar. Sie erlauben die Identifikation Antigen-spezifischer T-Zellen. Sie lassen zudem Aussagen über die Affinität und Bindungskonstante des TCR zu. Beim DimerX handelt es sich um ein rekombinantes Protein, das aus einem murinen IgG1-Molekül besteht. An beide Antigenbindungsstellen ist je ein MHC I-Molekül (erhältlich als H2-D^b oder H2-K^b) fusioniert. Der DimerX kann mit einem beliebigen Ligand des jeweiligen H2-Allels

beladen werden. Die Detektion erfolgt über einen PE-markierten Antikörper gegen den Fc-Teil des IgG1.

Durchführung

Direkte Färbung - Zur Färbung einer Probe werden 0,5 µg DimerX benötigt. Der DimerX wird zunächst über Nacht bei 37 °C mit dem entsprechenden Peptid beladen. Dazu werden zu 1 µl DimerX-Lösung (entspricht 0,5 µg DimerX) 0,68 µl einer 2 mM Peptidlösung (20 % DMSO in PBS) gegeben und das Gemisch über Nacht inkubiert. Anschließend werden 0,5 µg PE-markierter α -Maus-IgG1-Antikörper (0,5 µg/µl) zugegeben und 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µg IgG1 -Antikörper (α -TNP, 1 µg/µl) wird weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Zur Färbung wird der DimerX zu 20 µl pro Probe in FACS-Puffer verdünnt und auf die Probe gegeben. Die Probe (bis etwa 1.000.000 Zellen) wird zuvor in einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte für 30 Minuten bei 4 °C mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene, sowie mit einem unmarkierten α -CD16/CD32-Antikörper (3 µg/Probe) zur Blockade der Fc-Rezeptoren in 50 µl FACS-Puffer inkubiert. Der DimerX wird direkt dazugegeben, die Probe mit der Pipette durchmischt und für weitere 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden 2-mal in FACS-Puffer gewaschen und nach Zugabe von PI durchflusszytometrisch analysiert.

DimerX-Dissoziation - Zur Messung der Dissoziation des DimerX werden 1.000.000 Zellen zunächst wie oben beschrieben mit dem DimerX gefärbt. Die Färbung erfolgt jedoch, bei entsprechender Erhöhung der Mengen der jeweiligen Agenzien, in einem Volumen von 1 ml. Nach der Färbung werden die Zellen 2-mal in FACS-Puffer gewaschen und in 1 ml FACS-Puffer nach Zugabe von 20 µg α -H2-Db-Antikörper bei RT inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten werden Proben von je 100 µl entnommen, mit 900 µl 1 % Paraformaldehyd in PBS gemischt und bis zur durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert.

2.2.3.2 FoxP3- Färbung

Nachdem FoxP3 als Transkriptionsfaktor nur intrazellulär vorkommt müssen die Zellen vor der α -FoxP3-Antikörperfärbung fixiert und permeabilisiert werden. Die Zellen werden zunächst wie oben beschrieben 30 Minuten bei 4 °C in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene in je 50 µl FACS-Puffer gefärbt. Nach 2-maligem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen über Nacht bei 4 °C in 200 µl Fix/Perm-Puffer inkubiert. Nach 2-maligem Waschen in Perm-Puffer werden die Zellen 30 Minuten bei 4 °C in 50 µl Perm-Puffer mit dem α -

FoxP3-Antikörper gefärbt. Die Zellen werden anschließend 2-mal in Perm-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3.3 ⁵¹Cr-Freisetzungstest

Prinzip

Der Chromfreisetzungstest ist die Standardmethode zur Bestimmung der spezifischen Lyse von Zielzellen durch CTLs. Der Test beruht auf der Tatsache, dass intakte Zellen radioaktiv markiertes Natriumchromat aufnehmen und Cr⁶⁺ zu Cr³⁺ reduzieren, welches im Zytosol zurückgehalten wird. Die Zielzellen werden mit Na₂⁵¹CrO₄ beladen und anschließend mit CTLs inkubiert. Werden die Zielzellen nun von den CTLs lysiert wird das in den getöteten Zellen vorhandene ⁵¹Cr³⁺ freigesetzt und kann im Überstand gemessen werden. Durch gleichzeitige Bestimmung der Gesamtaktivität (Lyse mit Detergenz) und der ⁵¹Cr³⁺-Spontanfreisetzung der markierten Zielzellen lässt sich die Lyse der Zielzellen durch die CTLs errechnen.

Exprimieren die verwendeten Zielzellen das Peptid, für das die CTLs spezifisch sind, nicht oder in nicht ausreichender Menge, so müssen die Zielzellen zuvor mit dem entsprechenden Peptid beladen werden.

Durchführung

Als Zielzellen dient die Maus-Tumor-Zelllinie EL4. Die benötigte Anzahl an EL4-Zellen wird in einem 14 ml-Röhrchen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird im verbleibenden Überstand resuspendiert und mit [⁵¹Cr]-Natriumchromat (10 µl je 1x10⁶ Zellen, etwa 100 µCi) und Peptid (10 µg je 1x10⁶ Zellen) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden 2-mal mit 2 ml TM gewaschen und in 2 ml Medium 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zentrifugiert, und in TZM resuspendiert (1x10⁵ Zellen/ml). Je 100 µl der Zellsuspension werden in eine Kavität einer 96-Kavität-Rundbodenplatte gegeben. Hier wurden bereits titrierten Zahlen an Effektor-T-Zellen in je 100 µl TZM vorgelegt. Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung werden 100 µl der EL4-Suspension mit 100 µl TZM, beziehungsweise zur Bestimmung der Maximalfreisetzung mit 100 µl Tiriton-X-Lösung gemischt. Die Platte wird 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Je 50 µl des Überstandes werden auf eine 96-Kavität-Festphasenscintillationsplatte transferiert, bei 56 °C getrocknet und ausgezählt. Die spezifische Lyse errechnet sich wie folgt:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Counts Probe} - \text{Counts Spontan freisetzung})}{(\text{Counts Maximalfreisetzung} - \text{Counts Spontan freisetzung})}$$

2.2.3.4 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Prinzip

Der *in vivo* Zytotoxizitätstest dient wie der ^{51}Cr -Freisetzungssassay der Analyse der lytischen Funktion zytotoxischer T-Zellen. Der Test erlaubt die Analyse direkt im Versuchstier. Der Test beruht auf der Injektion syngener Peptid-beladener Zellen die als Ziel für die Effektorzellen dienen. Um den Test zu standardisieren wird eine zweite Gruppe an Zellen koinjiziert, diese Zellen sind nicht Peptid-beladen und sollten nicht lysiert werden, auf diese Zellen wird die Anzahl der Peptid-beladenen Zellen bezogen. Kommt es zur Lyse der Zielzellen verändert sich entsprechend das Verhältnis der beiden Zellpopulationen zueinander (vergleiche Abbildung 2.3). Normalerweise werden als Ziel- und Referenzzellen syngene Milzzellen verwendet. Die Auswertung erfolgt durchflusszytometrisch. Die injizierten Zellen werden zur Unterscheidung von endogenen Zellen mit CFSE markiert. Die Markierung mit zwei verschiedenen Konzentrationen an CFSE erlaubt die Unterscheidung der Zellen untereinander. Die Länge der Inkubation der Zellen im Tier erlaubt die Steuerung der Sensitivität des Tests.

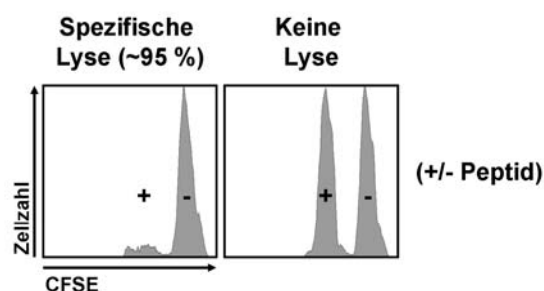


Abbildung 2.3: Beispielhafte Darstellung der Analyse eines *in vivo* Zytotoxizitätstests

In den abgebildeten Histogrammen sind die Analysen der Zellzahl der CFSE-markierten Zielzellen aus einem immunisierten und einem nicht immunisierten Tier dargestellt. In beiden Fällen bleibt die nicht mit Peptid beladene CFSE⁺⁺-Population in vollem Umfang erhalten und dient daher als Referenzpopulation. Sind aktivierte Peptid-spezifische CD8⁺-T-Zellen vorhanden, werden die Peptid-beladenen CFSE⁺-Zellen lysiert, deren Anzahl nimmt also, im Vergleich zur CFSE⁺⁺-Population ab.

Durchführung:

Milzzellen aus syngenen Mäusen werden zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und nach Erythrozytenlyse (Durchführung siehe unten) je zur Hälfte mit 4 μM (CFSE⁺⁺) beziehungsweise 0,4 μM (CFSE⁺) CFSE markiert. Nach der Markierung werden die Zellen zu 1×10^7 Zellen/ml in FCS-freiem Medium für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Den CFSE⁺-Zellen wird das entsprechende Peptid dabei in einer Konzentration von 1 μM zugesetzt. Die Zellen werden jeweils 2-mal in PBS gewaschen, gezählt und in

einem 1:1-Verhältnis miteinander gemischt. Die Zellkonzentration wird auf $6,7 \times 10^7$ Zellen/ml eingesellt und jeweils 300 μ l pro Tier i.v. injiziert. Zur Bestimmung des Ausgangsverhältnisses der beiden Zellpopulationen werden die Zellen in nicht immunisierte Tiere injiziert. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit werden den Tieren die Milzen entnommen und zur durchflusszytometrischen Untersuchung aufgearbeitet. Das Verhältnis der beiden CFSE-markierten Populationen wird bestimmt. Dabei werden von jeder Probe eine definierte Anzahl an CFSE⁺⁺-Zellen gemessen. Die Zahl der entsprechenden CFSE⁺-Zellen erlaubt nach folgender Formel die Berechnung der spezifischen Lyse.

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 \times \frac{N_{neg} - N_{Immu}}{N_{neg}}$$

N_{neg} = Anzahl der CFSE⁺-Zellen der nicht-immunisierten Kontrollmaus

N_{Immu} = Anzahl der CFSE⁺-Zellen der immunisierten Maus

2.2.3.5 Extrazelluläre IFN- γ -Analyse nach *in vitro* Peptid-Restimulation

Prinzip

Die Fähigkeit bei Antigen-Kontakt IFN- γ zu sezernieren ist eine wichtige Funktion zytotoxischer T-Zellen und wird daher zur Charakterisierung der Zellen herangezogen. Um die Zellen zu aktivieren werden sie *in vitro* mit Peptid-beladenen Zellen inkubiert. Das Zytokin wird dabei in den Überstand abgegeben und kann per ELISA quantifiziert werden. Der Test wird durch die Verwendung definierter Zellzahlen standardisiert.

Durchführung

Für die Aktivierung *in vitro* generierter T-Zellen dienen EL4-Zellen als APCs, diese werden zuvor für 2 Stunden mit titrierten Mengen an Peptid in einer 96-Kavitätenplatte (10.000 Zellen pro Kavität) in TSM inkubiert. Die Zellen werden in der Platte gewaschen und mit je 100.000 Effektorzellen inkubiert. Nach 16 Stunden werden jeweils 100 μ l des Überstandes abgenommen und bis zur Analyse per ELISA bei -20 °C gelagert.

Die Aktivierung von direkt entnommenen Zellen geschieht durch einfache Zugabe von Peptid zur Einzelzellsuspension in TSM. Dazu werden jeweils 1.000.000 Milz-beziehungsweise Lymphknotenzellen in 100 μ l TSM in eine 96-Kavitäten-Rundbodenplatte gegeben und jeweils 100 μ l verdünntes Peptid in TSM zugegeben.

Nach 16 Stunden werden jeweils 100 µl des Überstandes abgenommen und bis zur Analyse per ELISA bei -20 °C gelagert.

2.2.3.6 Intrazelluläre IFN- γ -Analyse nach *ex vivo* Peptid-Restimulation

Prinzip

Neben der Analyse des Zytokins im Zellüberstand besteht die Möglichkeit, die Zellen spezifisch zu aktivieren und die Sezernierung des synthetisierten Zytokins durch Blockade des Golgi-Apparats zu unterbinden. So sammelt sich das Zytokin intrazellulär an und kann, nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert werden. Diese Methode erlaubt weniger genaue Quantifizierungen, jedoch können die IFN- γ -produzierenden Zellen genau identifiziert werden. Nicht Peptid-restimulierte Zellen erlauben die Analyse des Hintergrundsignals

Durchführung

Für die Aktivierung werden die Zellen direkt entnommen und die Einzelzellsuspensionen in TZM zu jeweils 1.000.000 Zellen pro Kavität in eine 96-Kavitäten-Rundbodenplatte gegeben. Es werden jeweils zwei Proben angesetzt. Beiden Proben wird Brefeldin A (1 µg/ml) zugesetzt. Einer Probe wird zudem 1 µM Peptid zugesetzt. Die Zellen werden 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen mit markierten Antikörpern gegen Oberflächenantigene, wie zuvor beschrieben, gefärbt. Nach 2-maligem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen mit jeweils 200 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden anschließend 2-mal in Saponinpuffer gewaschen. Die Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten α -IFN- γ -Antikörper erfolgt in 50 µl Saponinpuffer für 30 Minuten bei 4 °C. Anschließend werden die Zellen 2-mal in Saponinpuffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Alle Experimente wurden mit 6 bis 10 Wochen alten Tieren durchgeführt. Jede Behandlung der Tiere wurde stets in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Alle Injektionen wurden mit 1 ml Spritzen und Größe 27 Kanülen durchgeführt.

2.2.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgt über einen Einschnitt in die Schwanzarterie. 2 bis 3 Tropfen Blut werden in 250 µl Blutpuffer aufgenommen und bis zur Aufarbeitung auf Eis gelagert. Zur Erythrozytenlyse wird die Probe mit 5 ml ACK-Puffer gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.4.2 Organentnahmen und Zellpräparation

Zur Entnahme der Organe werden die Tiere mit CO₂ oder durch cervikale Dislokation getötet. Die Organe werden entnommen und zunächst mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze durch ein 70 µm-Nylonsieb gedrückt, die Zellen werden mit PBS in ein 50 ml-Röhrchen gespült und abzentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml kaltem ACK-Puffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und gezählt.

2.2.4.3 Entnahme von Knochenmark

Das Knochenmark wird aus den Knochen der Hinterläufe entnommen. Die Knochen werden von allen Sehnen, Muskeln und Bindegewebe gesäubert und mit PBS abgespült. Anschließend werden beide Enden eines Knochens mit einer sterilen Schere abgetrennt und das Knochenmark mit einer Spritze (100 Sterican Größe 18-Kanüle) mit PBS ausgespült und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet.

2.2.4.4 Betäubung

Zur Rasur, transkutanen Immunisierung, Tumorinokulation, sowie zur i.d. Injektion wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin und Rompun betäubt. Dazu wurden 2 ml Ketamin-Lösung mit 800 µl Rompun-Lösung gemischt und vor Gebrauch mit PBS 1:5 verdünnt. Zur Betäubung wurde den Tieren, je nach Größe und Gewicht, zwischen 100 und 250 µl i.p. verabreicht.

2.2.4.5 Rasur

Die Rasur erfolgte an betäubten Mäusen. Zunächst wurde mit einem Langhaarschneider eine etwa 10 cm² große Fläche auf dem Rücken der Tiere enthaart. Die Stelle wurde anschließend mit einem Rasier glatt rasiert.

2.2.4.6 Transkutane Immunisierung

Die transkutane Immunisierung erfolgte an betäubten und zuvor rasierten Mäusen. Zur Immunisierung wird der Inhalt eines Aldara-Sachets auf einem Stück Nescofilm mit einer Pipettenspitze auf fünf 50 mg-Aliquots verteilt. Die entsprechende Menge

des Peptids (10 mM in DMSO) wird in ein Aliquot pipettiert und mit der Pipettenspitze so lange vermischt bis eine homogene Masse entsteht. Die so zubereitete Impfmischung wird auf die rasierte Fläche aufgetragen und für etwa 5 Sekunden leicht einmassiert. Für Immunisierungen mit der Wirkstoff-freien Salbengrundlage wird entsprechend verfahren. Bei intradermaler Injektion des Peptids wird zuerst die Injektion vorgenommen und dann die Aldara-Creme appliziert.

2.2.4.7 Immunisierung mit BMDCs

Zur Immunisierung werden die BMDCs wie oben beschrieben generiert, aktiviert und Peptid-beladen. Die Zellen werden in 500 µl PBS suspendiert i.p. injiziert.

2.2.4.8 Adoptiv-Transfer

Zum adoptiven Transfer werden Milzzellen zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und der Anteil der CD8⁺-T-Zellen per durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die der gewünschten CD8-Zellzahl entsprechende Menge an Zellen wird in 300 µl PBS suspendiert und i.v. appliziert.

2.2.4.9 Injektion von Antikörpern

PC61 - 500 µg des Antikörpers werden in 500 µl PBS i.p. fünf Tage vor der Immunisierung der Mäuse appliziert.

GK1.5 - Je 100 µg des Antikörpers werden in 500 µl PBS 5, 3 und 1 Tag vor, sowie 1 Tag nach der ersten Immunisierung i.p. verabreicht.

FKG-45 - Je 100 µg des Antikörpers werden in 300 µl PBS ab der ersten Immunisierung 3-mal im Abstand von je 24 Stunden i.v. appliziert.

2.2.4.10 Tumorinokulation und –messung

Zur Inokulation werden, in der Log-Phase befindliche, EG.7-Zellen geerntet, gezählt und in PBS zu 4×10^6 Zellen/ml in PBS suspendiert. Je 100 µl werden betäubten Mäusen s.c. in die linke Flanke inokuliert. Das Tumorwachstum wird 3-mal pro Woche überprüft und der Durchmesser des Tumors in zwei Dimensionen mit einer Schieblehre gemessen. Erreicht der Tumor eine Größe von 20 auf 20 mm werden die Tiere in CO₂ abgetötet.

2.2.4.11 Entnahme von Ohrbiopsien und PCR

Zur Typisierung der Mäuse werden mit einem Ohrlocher Biopsien entnommen. Die Biopsien werden über Nacht bei 55 °C in 20 µl Ohrpuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K inkubiert. Die Mischung wird nach Zugabe von 480 µl Wasser zur Inaktivierung der

2. Material und Methoden

Proteinase 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und kann anschließend für die PCR verwendet werden.

Die PCR-Reaktionsmischungen werden nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Reagenz	Volumen [µl]
DEPC-Wasser	29,1
10x Puffer	4
MgCl ₂ , 25 mM	1,6
dNTPs, mM	0,08
Primer 102	0,2
Primer 103	0,4
Primer 104	0,2
Taq-Polymerase	0,4
DNA	4

Es wird folgendes PCR-Programm zu Reaktion verwendet:

5 min	95 °C	35 x
10 s	95 °C	
10 s	62 °C	
15 s	72 °C	
7 min	72 °C	

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgt per Elektrophorese auf einem 2 %igen Agarosegel mit 0,005 % Ethidiumbromid in DNA-Laufpuffer. Je 10 µl der PCR-Lösung werden mit 1 µl Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 12 V/m durchgeführt. Die Detektion erfolgt durch UV-Bestrahlung.

3 Ergebnisse - Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

3.1 Charakterisierung der TCR-transgenen St-Mausstämme

Um den Einfluss der T-Zellrezeptordichte auf die Funktion zytotoxischer T-Zellen detailliert zu untersuchen, sollten verschiedene TCR-transgene Mausstämme generiert werden, die den gleichen MHC I-restringierten TCR, jedoch in unterschiedlicher Dichte auf der Oberfläche exprimieren. Dazu wurde ein bereits existierendes Modell herangezogen. Die so genannten St42-Mäuse (Kast et al., 1989) sind transgen für einen $V\alpha 16 V\beta 1$ -TCR der das SGPSNTPPEI-Peptid aus dem humanen Adenovirus im Kontext des H2-D^b-MHC I erkennt. Das Transgen wurde unter dem humanen CD2-Promoter ungerichtet ins Genom integriert. Der Promoter ist relativ schwach, sodass die Expressionsstärke von der Umgebung der Integrationsstelle abhängt (Greaves et al., 1989). Dieses System sollte sich daher also hervorragend dazu eignen, verschiedene Klone mit unterschiedlicher Expressionsstärke zu generieren. In der Tat konnte von Rene Toes ein zweiter Stamm, der St40-Stamm generiert werden, dieser exprimiert nur sehr geringe Mengen des TCR (Toes et al., 1996). Die TCR-Expression ist jedoch so gering, dass die Zellen kaum mehr selektioniert werden. Somit können für Experimente jeweils nur äußerst wenige Zellen gewonnen werden, was die Analyse der Zellen sehr erschwert. So finden sich in den Milzen der St42-Mäuse zwischen 3 und 8 Millionen transgene T-Zellen, während sich aus Milzen der St40-Mäuse zwischen 100.000 und 400.000 transgene T-Zellen isolieren lassen. Die Zellen können zudem nur unvollständig aktiviert werden und sind nicht vollständig funktionell (Hofmann et al., 2004). Der St40-Stamm eignet sich daher nur sehr bedingt für vergleichende Experimente mit dem St42-Stamm. Aus diesem Grund sollte ein weiterer Stamm generiert werden, der sich besser für vergleichende Experimente eignete. Matthias Hoffman generierte daher den St35 Stamm. Dieser sollte mehr TCR als der St40-Stamm exprimieren, sich aber in der Expressionsstärke deutlich vom St42 Stamm unterscheiden.

In TCR-transgenen Mäusen werden aufgrund des bereits vorhandenen vollständigen TCR Gens hauptsächlich transgene T-Zellen selektioniert, da der transgene TCR sehr früh das Abschalten der Prozesse der somatischen Rekombination induziert und so die Rekombination eines anderen TCR unterbindet. Die Spezifität des Rezeptors

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

für MHC I- oder MHC II-Peptid-Komplexe bleibt erhalten, so dass, je nach Spezifität des transgenen TCR, entweder CD4- oder CD8-Zellen selektioniert werden. Es finden sich in solchen Mäusen also fast nur CD4- beziehungsweise CD8-Zellen mit dem transgenen TCR. In seltenen Fällen kommt es dennoch zur somatischen Rekombination einer weiteren TCR-Kette, so dass auch nicht TCR-transgene T-Zellen, beziehungsweise T-Zellen mit zwei verschiedenen TCRs auftreten können. Diese Zellen können die erhaltenen Ergebnisse verfälschen und machen die Präparation sauberer TCR-transgener Populationen sehr schwer oder gar unmöglich. Um dieses Problem zu umgehen, werden TCR-transgene Stämme häufig auf einen genetischen Hintergrund gekreuzt, in dem die Maschinerie für die somatische Rekombination inaktiviert ist. Im RAG2^{-/-}-System ist das RAG2-Gen durch einen Knock-Out inaktiviert, so dass jegliche somatische Rekombination unterbunden ist. In solchen Knock-Out Mäusen finden sich also weder CD4- noch CD8-positive T-Zellen. Da RAG2 zur Rekombination des BCRs benötigt wird finden sich in diesen Mäusen auch keine B-Zellen. Bringt man nun durch die Kreuzung mit TCR-transgenen Mäusen ein bereits rekombiniertes TCR-Gen in den RAG2^{-/-}-Hintergrund ein, so exprimieren die Thymozyten nur den codierten TCR und können positiv selektioniert werden. Die aus RAG2^{-/-}-TCR-transgenen Mäusen erhaltenen T-Zellen sind also zu 100 % transgen.

Da die St-T-Zellen in Adoptiv-Transfer-Experimenten eingesetzt werden sollten, war es notwendig, eine Größe in das Modell zu integrieren, die es ermöglicht, die transgenen T-Zellen von den endogenen Zellen des jeweiligen Empfängertieres zu unterscheiden. Hierzu sind zwei etablierte und einfach anzuwendende Modelle bekannt. Das Ly5- oder CD45- und das Thy1- oder CD90-System. Hierbei handelt es sich jeweils um ein Oberflächenantigen auf allen hämatopoetischen Zellen (Ly5), beziehungsweise auf allen T-Zellen (Thy1). Von beiden Antigenen gibt es zwei verschiedene Allele die kodominant exprimiert und mit CD45.1 und CD45.2 beziehungsweise CD90.1 und CD90.2 bezeichnet werden. Da für beide Allele spezifische Antikörper kommerziell erhältlich sind, lassen sie sich durchflusszytometrisch voneinander unterscheiden. In den Adoptiv-Transfer-Experimenten sollten B6-Mäuse als Empfängertiere verwendet werden. B6-Mäuse tragen das CD45.2- und das CD90.2-Allel. Entsprechend sollten die St35-Mäuse homozygot für das CD45.1- und das CD90.2-Allel, die St42-Mäuse dagegen homozygot für das CD45.2- und das CD90.1-Allel gezüchtet werden. Somit wäre

jeweils die Unterscheidung der transgenen T-Zellen von den B6-Zellen, sowie die Unterscheidung der transgenen Zellen untereinander gewährleistet.

Im Folgenden sollen nun die transgenen T-Zellen der entsprechend generierten St35- und St42-Mäuse genauer charakterisiert werden.

3.1.1 St42-T-Zellen exprimieren mehr transgenen-TCR als St35-T-Zellen

Um die St-Mausstämme auf den transgenen TCR zu testen, wurde zunächst eine Genotypisierung der Mäuse vorgenommen. Hierfür wurden den Mäusen Ohrbiopsien entnommen und per PCR auf das Vorhandensein des Transgens im Genom getestet. Die für die Typisierung verwendeten Primer sind spezifisch für eine Region im Gen das für die V β 1-Kette des TCR codiert. Da das entsprechende Gen auch in den Wild-Typ-Mäusen vorhanden ist sollten die Primer auch in den Wild-Typ-Mäusen ein Amplifikat erzeugen. Da hier jedoch die entsprechenden Exons noch im Gen vorhanden sind, sollte sich aus dem Wild-Typ-Gen ein längeres Amplifikat ergeben. Dieses sollte auch in den transgenen Tieren zu detektieren sein, da hier die Wild-Typ-Gene ebenfalls vorhanden sind. Somit müssten sich die transgenen Tiere von den Wild-Typ-Tieren durch ein zusätzliches, kürzeres Amplifikat unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen hetero- oder homozygot transgenen Tieren wäre entsprechend nicht möglich.

In Abbildung 3.1 ist zu sehen, dass, wie erwartet, in den St35- und den St42-Proben nach der PCR im Agarosegel 2 Banden detektiert werden konnten. Eine davon hatte eine Länge von 400, die andere von 200 Basenpaaren. Es ist zu erkennen, dass die 200 Basenpaar-Bande nur in den St-Mäusen zu detektieren war. Sie zeigte also das vorhandene Transgen im Genom an. Die 400 bp Bande repräsentierte das entsprechende Wild-Typ-TCR-Gen. Wie zu erwarten, war in der Wild-Typ- und der RAG2^{-/-}-Probe lediglich die 400 bp Bande zu erkennen. Die Genotypisierung zeigte somit, dass St35- und St42-Mäuse das Gen für den transgenen TCR beherbergen und sich der transgene Genotyp klar vom Wild-Typ unterscheiden ließ.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

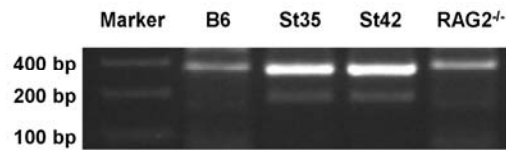


Abbildung 3.1: St35- und St42-Mäuse haben das TCR-Transgen in das Genom integriert.

Genomische DNA aus Ohrbiopsien von B6-, St35-, St42- und RAG2^{-/-}-Mäusen wurden per PCR auf das Vorhandensein des TCR-Transgens untersucht. Dargestellt ist eine UV-Analyse der jeweiligen PCR Produkte im Agarosegel.

Nachdem der Nachweis der Integration des Transgens keine Rückschlüsse auf die Funktionalität des Transgens zulässt, sollten phänotypische Analysen zeigen, ob der Rezeptor tatsächlich exprimiert wird und zur Bildung transgener CD8⁺-T-Zellen führt. Aufgrund der Kreuzung der TCR-transgenen Tiere auf den RAG2^{-/-}-Hintergrund (Nachweis der homozygoten Knock-Outs per PCR, nicht gezeigt) lässt sich die Funktion des genotypisch nachgewiesenen TCR-Transgens einfach mittels einer durchflusszytometrischen Analyse der Milzzellen der Tiere belegen. Wie bereits erwähnt entwickeln sich in RAG2^{-/-}-Tieren keinerlei T- und B-Zellen. Färbte man die Milzzellen dieser Tiere nun zur durchflusszytometrischen Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD4, CD8 und das B-Zelloberflächenantigen B220, so ließ sich, wie in Abbildung 3.2 A zu sehen ist, für keines der Antigene ein Signal messen. Im Gegensatz dazu erkannte man in den Milzzellen der B6-Mäuse Signale für alle drei Antigene. Klar zu erkennen war zudem, dass die Analyse der Milzzellen aus St35- und St42-Mäusen jeweils lediglich ein Signal für das CD8-Antigen ergab. Es ließ sich also feststellen, dass der transgene TCR in beiden Stämmen funktionell exprimiert wurde und somit zur Selektion von CD8-positiven T-Zellen führte, welche sich entsprechend in der Peripherie der Tiere detektieren ließen.

Färbte man die Milzzellen von B6-, St35- und St42-Tieren mit Antikörpern gegen CD90.1, CD90.2, CD45.1 und CD45.2, so zeigte sich (Abbildung 3.2 B), dass die Zellen aus den B6-Milzzellen CD45.2 und zum Teil CD90.2 positiv waren. Dagegen fanden sich in St35-Milzen CD45.1- und CD90.2- positive Zellen, in St42-Milzen CD45.2- und CD90.1- positive Zellen. Die Tatsache, dass nur ein Teil der Zellen ein Signal für das jeweilige CD90-Antigen ergab, beruht darauf, dass sich das CD90-Antigen nur auf den T-Zellen befindet, das CD45-Antigen dagegen auf praktisch allen Milzzellen.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

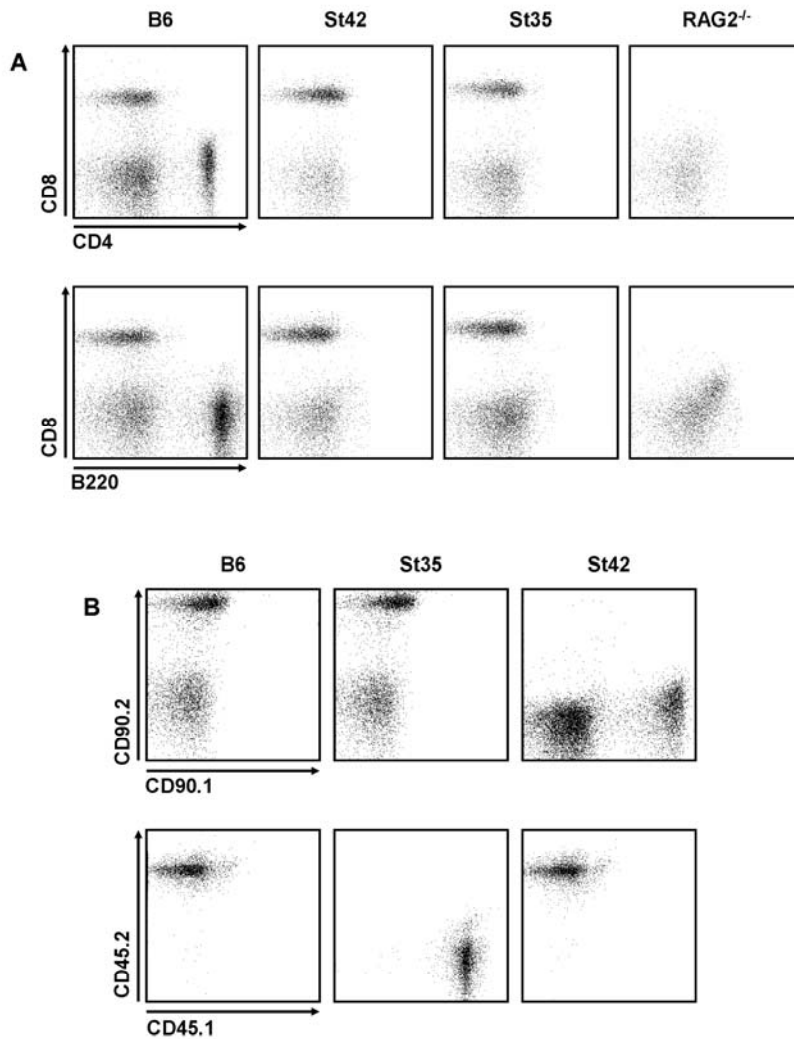


Abbildung 3.2: In der Peripherie der St35- und St42-Mäuse finden sich CD8⁺-T-Zellen, jedoch keine CD4⁺-T- und B-Zellen.

A) Milzzellen aus B6-, St35-, St42- und RAG2^{-/-}-Mäusen wurden mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD4-PE- und α -B220-FITC-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die jeweils gemessenen Fluoreszenzsignale auf PI-negativen Milzzellen.

B) Blutlymphozyten aus B6-, St35- und St42-Mäusen wurden mit α -CD90.2-APC-, α -CD90.1-PerCP-, α -CD45.2-FITC- und α -CD45.1-PE-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die jeweiligen Fluoreszenzsignale auf den Blutlymphozyten.

Um einen TCR spezifisch phänotypisch nachzuweisen, bietet sich die durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die beiden Isotypen der TCR-Ketten an. Da jedoch weder für die V α 16, noch für die V β 1 Ketten spezifische Antikörper erhältlich sind musste die exakte Phänotypisierung des TCR über die Spezifität des TCR für den H2-D^b-SGPSNTPPEI-Komplex erfolgen. Hierzu gibt es die Möglichkeit, den TCR mit einem fluoreszenzmarkierten, multimerisierten H2-D^b-SGPSNTPPEI Komplex anzufärben. Neben tetramerisierten und pentamerisierten MHC I-Komplexen ist ein dimerer Komplex, das so genannte

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

DimerX-System von Becton-Dickinson kommerziell erhältlich. Dabei handelt es sich um einen rekombinant hergestellten Komplex aus zwei MHC I-Molekülen die an die Antigen-bindenden Stellen eines IgG-Moleküls fusioniert sind. Zur Analyse wird der Komplex zuerst mit dem entsprechenden Peptid beladen und anschließend mit einem sekundären PE-markierten Antikörper gegen den Fc-Teil des Komplexes gefärbt.

Eine Färbung von Blutlymphozyten aus St35- und St42-Mäusen mit einem Antikörper gegen CD8 und dem SGPSNTPPEI·DimerX-Komplex ließ entsprechend Abbildung 3.3 erkennen, dass alle CD8-positiven Zellen aus St35- und St42-Mäusen ein SGPSNTPPEI-DimerX-Signal ergaben, jeweils alle CD8-positiven Zellen banden also den SGPSNTPPEI·DimerX-Komplex und sollten daher den H2-D^b-SGPSNTPPEI spezifischen transgenen TCR exprimiert haben. Im Vergleich dazu ließ sich feststellen, dass sich auf CD8-positiven Zellen aus B6-Mäusen praktisch kein SGPSNTPPEI·H2-D^b-DimerX-Signal messen ließ.

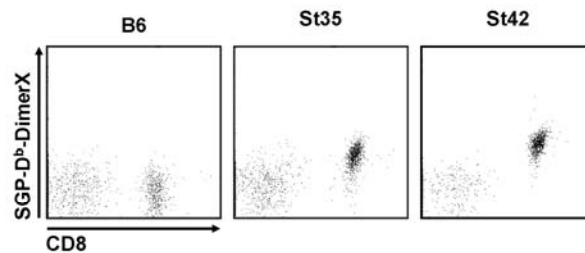


Abbildung 3.3: St35- und St42-CD8⁺-T-Zellen binden einen SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX-Komplex.

Blutlymphozyten aus B6-, St35- und St42-Mäusen wurden mit einem α -CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten und SGPSNTPPEI-beladenen H2-D^b-DimerX-Komplex gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt sind die Fluoreszenzsignale auf PI-negativen Blutlymphozyten.

Betrachtete man die SGPSNTPPEI·D^b-DimerX-Signale auf den St-Zellen genauer, so erkannte man, dass das DimerX-Signal auf St42-Zellen deutlich stärker als auf den St35-CTLs ausfiel.

Die Intensität des erhaltenen Signals ergab sich aus der Affinität des Rezeptors für den Peptid·MHC I-Komplex, sowie der Anzahl der vorhandenen TCR-Moleküle auf der Zelloberfläche. Um T-Zellen mit hoher Affinität von solchen mit hoher TCR-Expression zu unterscheiden wurden die Zellen zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD3 gefärbt. Das CD3-Signal zeigte die Anzahl der exprimierten TCRs an, ohne dass der Antikörper mit der Bindung des Dimers interferierte. Das Verhältnis

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

des DimerX-Signals zum CD3-Signal war damit ein Maß für die Affinität des TCR für den entsprechenden Peptid·MHC I-Komplex.

Wie in Abbildung 3.4 A zu sehen ist, ergab die Analyse des CD3-Signals ein im Vergleich zum DimerX-Signal sehr ähnliches Bild, auch hier zeigten die St42-CTLs ein stärkeres Signal, während St35-CTLs deutlich weniger CD3 exprimierten. Eine Analyse des Hintergrundsignals, das durch eventuell auftretende unspezifische Bindung des Antikörpers beziehungsweise des Dimers hervorgerufen werden kann, wurde in diesem Fall mit einem Antikörper anderer Spezifität und desselben Isotyps beziehungsweise zw. mit einem D^b-DimerX, der mit einem anderen Peptid beladen wurde, durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Kontrollen das gleiche Signal auf den Zellen ergaben. Das zuvor gemessene und das Hintergrundsignal erlaubten die Berechnung des jeweiligen spezifischen Signals (SFI = specific fluorescence intensity). So ergab sich für die St35-Zellen ein spezifisches DimerX-Signal von 693 SFI und ein CD3-Signal von 8866 SFI, auf St42-CD8⁺-Zellen waren dagegen 1509 SFI und 24828 SFI zu messen (Abbildung 3.4 B). Bildete man nun das Verhältnis aus CD3- und DimerX-Signal so ergab sich ein Wert, der die Affinität des TCR für den SGPSNTPPEI-H2-D^b-Komplex abzuschätzen erlaubte. Erwartungsgemäß ergab sich für beide Mausstämme in etwa der gleiche Wert (St35: 14,4; St42: 16,7).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

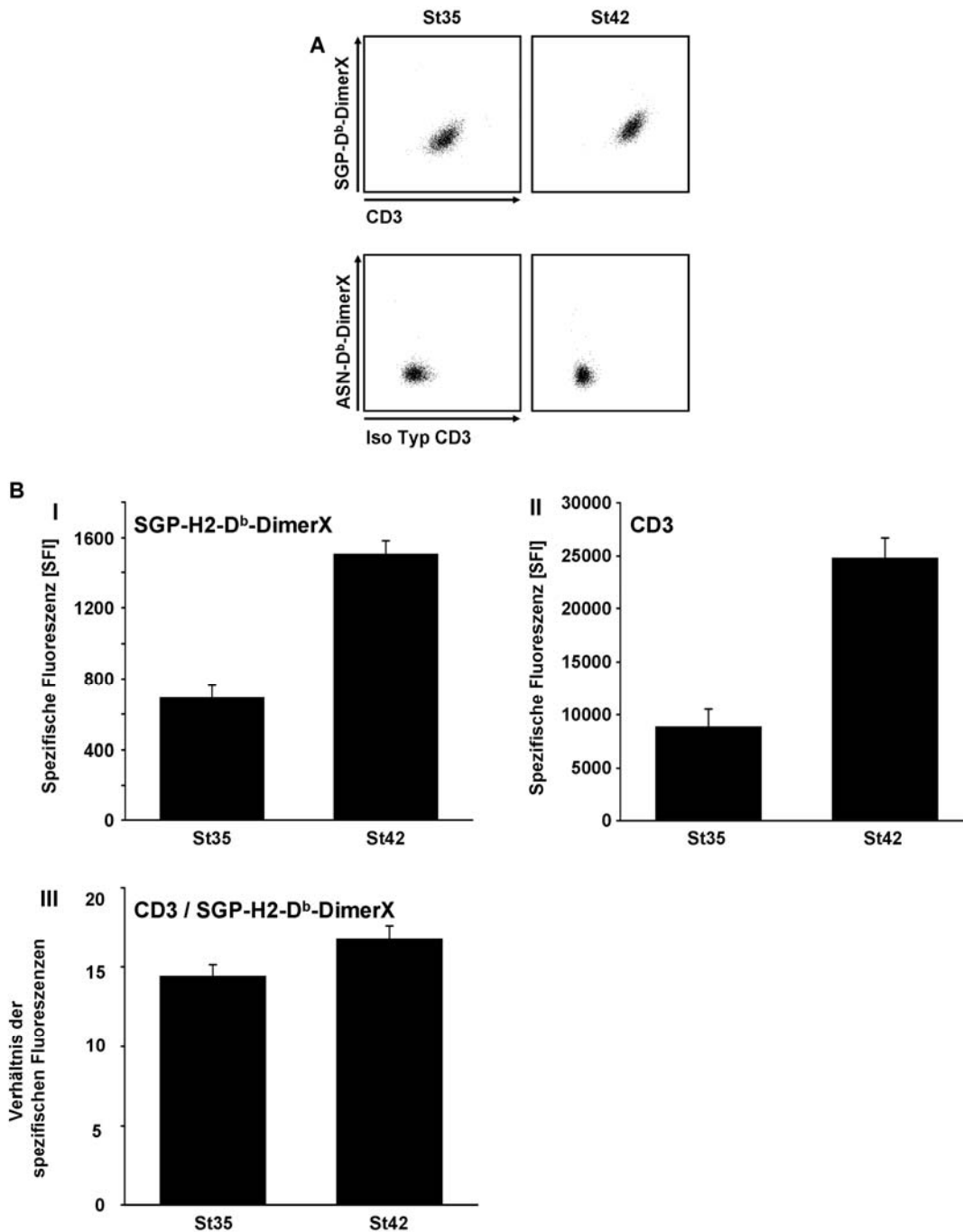


Abbildung 3.4: Die CD3-Expression auf St35- und St42-T-Zellen korreliert mit dem SGPNTPEI-H2-D^b-DimerX-Signal.

A) Blutlymphozyten aus St35- und St42-Mäusen wurden mit α -CD8-APC-Cy7- und α -CD3-APC-Antikörpern sowie einem PE-markierten und SGPNTPEI-beladenen H2-D^b-DimerX-Komplex gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Um die Spezifität der Signale zu bestimmen wurde in einem anderen Ansatz mit α -CD8-APC-Cy7-, einem zum α -CD3-Antikörper isotypen unspezifischen APC-markierten Antikörper sowie einem PE-markierten ASNENMETM-beladenen D^b-DimerX-Komplex gefärbt. Die jeweiligen Fluoreszenzsignale auf CD8⁺PI⁻-Lymphozyten sind in biexponentieller Form dargestellt.

B) Aus den entsprechend gemessenen Signalen wurde die jeweilige spezifische Fluoreszenz für SGPNTPEI-H2-D^b-DimerX (I) beziehungsweise CD3 (II) berechnet, aus diesen ließ sich dann das in III dargestellte Signalverhältnis berechnen.

Die Fehlerbalken indizieren jeweils die Standardabweichung aus fünf gemessenen beziehungsweise berechneten Werten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Um die Expression des transgenen TCR ins Verhältnis zur normalen TCR-Expression zu setzen, wurden periphere CTLs aus den St-Stämmen sowie aus B6-Mäusen auf CD8 und TCR β gefärbt. Wie zuvor beschrieben wurde auch hier das jeweilige Hintergrundsignal durch die Messung mit einem zum TCR β -Antikörper isotypen Kontrollantikörper bestimmt und entsprechend das spezifische Signal errechnet. Wie in Abbildung 3.5 A gezeigt ist ergab sich für die St35-CTLs ein Wert, der mit 673 SFI deutlich unter den für die St42-T-Zellen gemessenen 1694 SFI lag. Für B6-CTLs ergaben sich entsprechend 5073 SFI. Bildete man aus diesen Werten nun die jeweiligen Verhältnisse (Abbildung 3.5 B) so ergab sich, dass St42-CTLs etwa 3-mal weniger TCR exprimierten als die entsprechenden Wild-Typ-T-Zellen. Im Vergleich dazu exprimierten sie 2- bis 3-mal mehr transgenen TCR auf der Oberfläche als St35-CTLs. Die TCR-Expression der St35-CTLs war entsprechend etwa 7,5-mal niedriger als auf B6-T-Zellen.

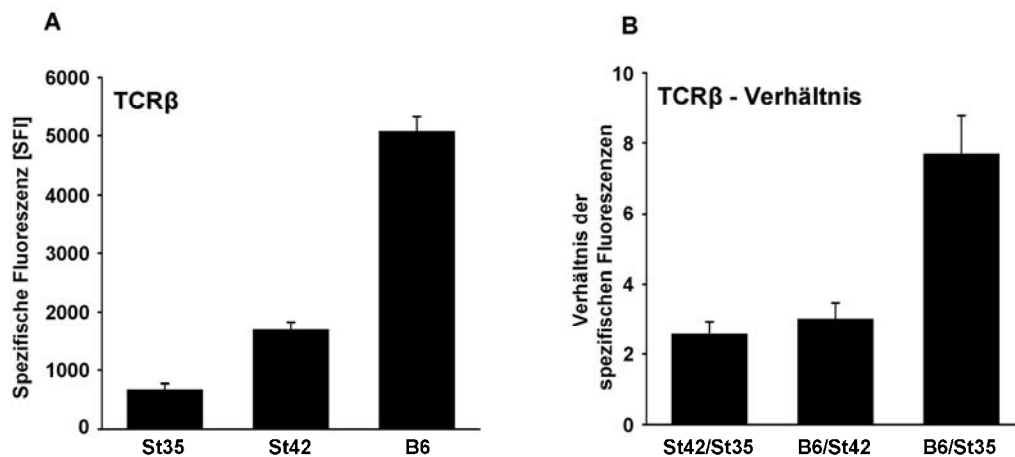


Abbildung 3.5: St35-T-Zellen exprimieren etwa 2- bis 3-mal weniger transgenen TCR als St42-T-Zellen.

A) Blutlymphozyten aus St35-, St42- und B6-Mäusen wurden mit α -CD8-APC-Cy7- und α -TCR β -PE-beziehungsweise mit α -CD8-APC-Cy7- und einem PE-markierten isotypen Antikörper gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und die spezifische Fluoreszenz für das TCR β -Signal auf CD8⁺PI⁻-Lymphozyten berechnet.

B) Aus den erhaltenen Signalen wurde das Verhältnis der spezifischen Signale für TCR β auf den CD8⁺-T-zellen der verschiedenen Mausstämmen berechnet. Die angegebene Standardabweichung errechnete sich aus jeweils 10 Werten, die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.1.2 Naive St35- und St42-CTLs zeigen ein leicht verändertes Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle

Nachdem sich die erhaltenen T-Zellen in der Expression des TCR deutlich voneinander unterschieden aber dennoch vergleichbar gut im Thymus selektioniert wurden, sollte zunächst geklärt werden, ob sich die niedrigere TCR-Expression der St35-T-Zellen in einer Überexpression anderer Oberflächenmoleküle bemerkbar macht, was Rückschlüsse auf eventuell auftretende Kompensationsmechanismen erlaubt.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass das CD5-Molekül eine wichtige Rolle bei der Selektion der Thymozyten sowie bei Aktivierung reifer T-Zellen spielt (Kassiotis et al., 2003; Azzam et al., 2001; Azzam et al., 1998). Es handelt sich dabei um ein auf der Oberfläche exprimiertes Protein, welches das TCR-Signal negativ reguliert. Eine Modifikation der Expression des CD5-Moleküls könnte die niedrigere TCR-Expression der St35-CTLs also in einem gewissen Maße kompensieren. Daher wurden die St35- und St42-T-Zellen, sowie CTLs aus B6-Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expressionsstärke des CD5-Moleküls hin untersucht. Hierzu wurden Milzzellen aus den verschiedenen Mäusen isoliert und zur durchflusszytometrischen Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD8 und CD5 gefärbt. Zur Bestimmung des spezifischen CD5-Signals wurde das Hintergrundsignal mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle für den CD5-Antikörper bestimmt. Wie in Abbildung 3.6 abgebildet, deutlich zu erkennen war fiel die Expression des CD5-Moleküls auf B6-CTLs deutlich höher aus als auf den St-CTLs. Die niedrigere TCR-Expression der St-CTLs schien sich also in der Herunterregulierung der CD5-Expression niederschlagen, was in einem verhältnismäßig stärkeren TCR-Signal resultieren könnte. Verglich man jedoch die CD5-Expression auf St35- und St42-T-Zellen, fiel auf, dass sich hier kein signifikanter Unterschied messen ließ. Die Expression war wider Erwarten auf den St42-T-Zellen sogar etwas höher als auf den St35-T-Zellen, so dass sich hier, im Vergleich der beiden St-Klone untereinander, keine Kompensation über die CD5-Expression vermuten ließ.

Nachdem sich bezüglich des CD5-Moleküls im Vergleich der St-CTLs untereinander kein signifikanter Expressionsunterschied zeigte, sollte die Expression weiterer, die Aktivierung und Funktion von CTLs beeinflussender Moleküle untersucht werden. Hierbei lag der Fokus auf Molekülen die bei der Bildung des TCR-Signalkomplexes

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

oder bei der Initiierung der immunologischen Synapse eine Rolle spielen. Diese Moleküle könnten also einen direkten Einfluss auf die TCR-Signalstärke sowie die Bindung zur APC haben. Hierzu wurden Milzzellen aus St35-, St42- und B6-Mäusen neben einem Antikörper gegen CD8 mit Antikörpern gegen die entsprechenden Antigene gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Färbungen mit den entsprechenden Isotypen erlaubten auch hier die Kalkulation der spezifischen Signalstärken.

In Abbildung 3.6 sind exemplarisch die Expressionsmuster für CD2, CD11a und CD28 zu sehen. Zur erkennen war, dass die Expression von CD2, welches einen Teil des TCR-Signalkomplexes ist, in etwa mit der Expression des TCR auf den verschiedenen T-Zellen korreliert. Betrachtete man die Expression des Integrins CD11a, so ergab sich auch hier kein deutlicher Unterschied zwischen den St-Klonen, es ließ sich jedoch eine leicht höhere Expression auf St35-Zellen messen. Das Signal für CD28, einem kostimulatorischen Molekül war dagegen auf den St-Zellen praktisch identisch. Für alle 3 betrachteten Moleküle ergab sich im Vergleich zum Wild-Typ eine deutlich reduzierte Expression. Die entsprechende Analyse von CTLA-4, CD24, CD137 und GITR ergab weder signifikante Unterschiede zwischen den St- und den B6-Zellen, noch zwischen den St-CTLs untereinander (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

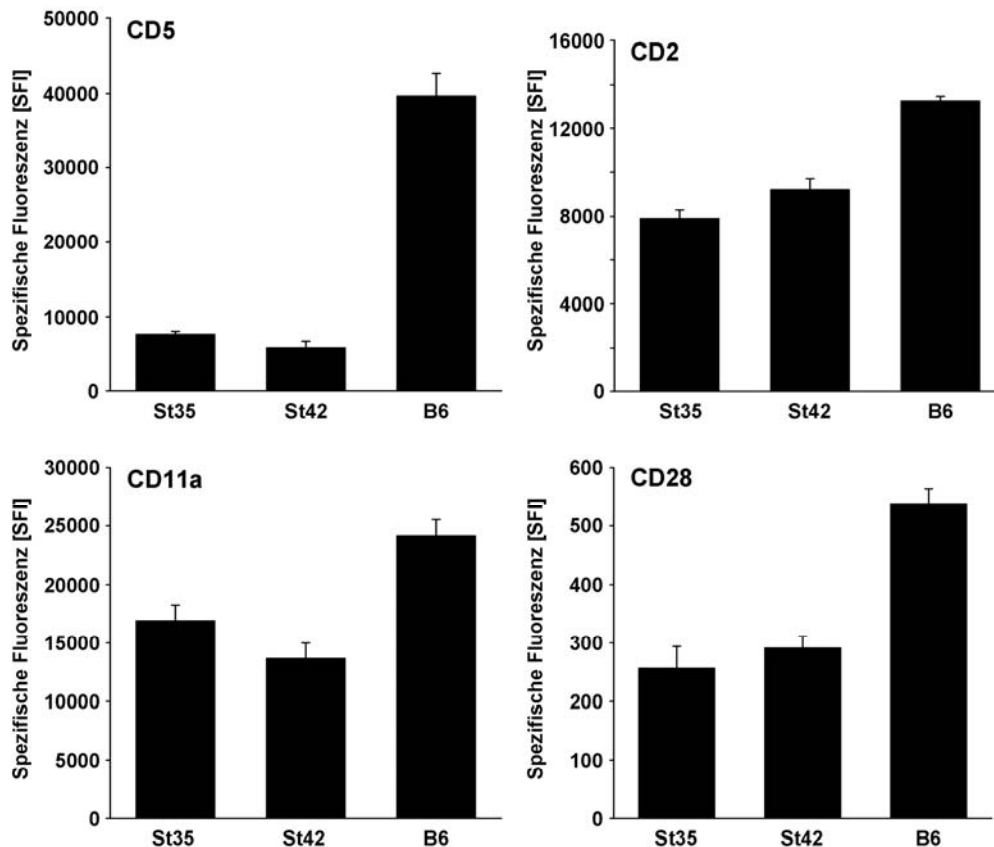


Abbildung 3.6: St35- und St42-CTLs zeigen im Vergleich zu B6-CTLs ein verändertes Expressionsmuster verschiedener Oberflächen-Antigene.

Blutlymphozyten aus St35-, St42- und B6-Mäusen wurden mit α -CD8-APC-Cy7- und PE-markierten Antikörpern gegen CD5, CD2, CD11a oder CD28 beziehungsweise entsprechenden PE-markierten isotypen Antikörpern gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und die spezifische Fluoreszenz für das jeweilige Signal auf CD8⁺PI⁻-Lymphozyten berechnet.

Angegeben ist die Standardabweichung aus mindestens fünf gemessenen Werten aus einem von 3 unabhängigen Experimenten.

Schließlich wurde für die 3 verschiedenen CTLs die Expression des CD8-Moleküls genauer betrachtet. Dieses bindet bei einer TCR-MHC I-Peptid-Interaktion direkt an das MHC I-Molekül und hat somit direkten Einfluss auf die Affinität/Avidität der T-Zell-APC-Interaktion. Um die Expression des CD8-Moleküls zu bestimmen, wurden Milzzellen der verschiedenen Mäusestämme zur durchflusszytometrischen Analyse mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt, die Stärke des Signals gemessen und um das Hintergrundsignal korrigiert. Betrachtete man die gemessenen Signale, so ergab sich ein sehr auffälliges Muster. In Abbildung 3.7 ist deutlich zu erkennen, dass mit Abnahme der TCR-Expression die Expression an CD8 zunahm. So ließ sich auf den St35-CTLs ein spezifisches CD8-Signal von 52326 SFI messen, dagegen war das Signal auf St42-CTLs mit 47020 SFI niedriger. Schließlich wurde auf B6 Zellen mit 35634 SFI das niedrigste Signal gemessen.

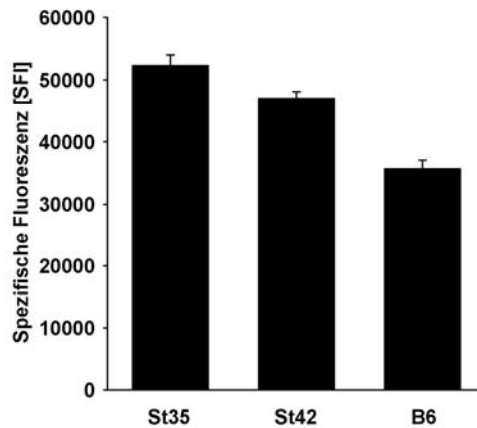


Abbildung 3.7: CD8-Expression auf St35-, St42- und B6-CTLs.

Blutlymphozyten aus St35-, St42- und B6-Mäusen wurden mit α -CD3-APC-, α -CD4-PE-Cy7- und α -CD8-PE-Antikörpern beziehungsweise mit α -CD3-APC-, α -CD4-PE-Cy7- sowie einem PE-markierten isotypen Antikörpern gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und die spezifische Fluoreszenz für das CD8-Signal auf CD3⁺CD4⁺PI⁻-Lymphozyten berechnet. Die Standardabweichung ergab sich aus jeweils 10 Werten, die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Da das CD8-Molekül direkt mit dem MHC I-Molekül auf der APC beziehungsweise der Zielzelle interagiert, ergibt sich aus dieser Beobachtung direkt die Frage, ob die vergleichsweise höhere CD8-Expression der St35-CTLs in einer gegenüber der St42-CTLs veränderten Bindung des TCR an MHC I-Peptid-Komplexe resultierte. Diese Frage ließ sich mit einer einfachen DimerX-Färbung nicht beantworten, da sich im DimerX-Signal lediglich die Anzahl der TCRs und deren Affinität widerspiegelte (Abbildung 3.4 B). Neben der Messung der Wahrscheinlichkeit der DimerX-Bindung, was sich durch die einfache Färbung bestimmen ließ, bestand die Möglichkeit, die Stabilität der Bindung zu messen. Hierzu wurde die Zerfallsrate der gebildeten Komplexe und damit des DimerX-Signals gemessen. DimerX-gefärbte Zellen wurden nach der Färbung gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur zusammen mit einem Antikörper gegen H2-D^b inkubiert. Der Antikörper fing die freigewordenen DimerX-Komplexe ab, sodass keine neue TCR-DimerX-Bindung erfolgen konnte. Über einen Zeitraum von 90 Minuten wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, mit Paraformaldehyd fixiert und durchflusszytometrisch zur Bestimmung des spezifischen Signals analysiert. In den Proben die zu späteren Zeitpunkten entnommen wurden, sollte das DimerX-Signal also schwächer ausfallen. Hätte die höhere CD8-Expression nun die TCR-DimerX-Bindung auf St35-CTLs stabilisiert, hätte dies in langsamerem Zerfall des DimerX Signals resultiert. In Abbildung 3.8 ist das spezifische DimerX-Signal von St35- und St42-CTLs in einem

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

DimerX-Zerfallsexperiment über einen Zeitraum 90 Minuten zu sehen. Wie erwartet fiel das Signal in den St42-CTLs höher aus als das auf den St35-CTLs. Es war außerdem zu erkennen, dass das Signal auf beiden CTL-Klonen mit der gleichen Rate zerfiel. Die höhere CD8-Expression in den St35-CTLs schien also keinen Einfluss auf die Bindung des TCR and den SGPSNTPPEI-H2-D^b-Komplex zu haben.

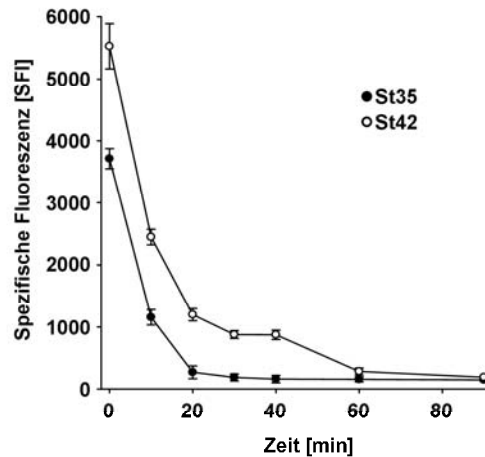


Abbildung 3.8: St35-T-Zellen zeigen die gleiche SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX-Dissoziation wie St42-T-Zellen.

Milzzellen aus St42- (offene Symbole) und St35- (gefüllte Symbole) Mäusen wurden mit einem α -CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX beziehungsweise einem ASNENMETM-H2-D^b-DimerX gefärbt und anschließend bei Raumtemperatur mit einem α -H2-D^b-Antikörper inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, fixiert, durchflusszytometrisch analysiert und die jeweilige spezifische Fluoreszenz berechnet. Angegeben ist die Standardabweichung aus 3 Werten von einem von 2 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Die Expression des transgenen TCR ist über die ganze Lebensdauer der Tiere stabil

Im Weiteren sollte eine Analyse der CTLs zeigen, ob die Expression des TCR in den St-Mäusen über die Lebensdauer der Tiere konstant bleibt, oder ob es zu Schwankungen in der Expression kommt, die den Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen Stämmen eventuell verkleinern. Entsprechend wurden Blutlymphozyten aus Mäusen beider Stämme verschiedenen Alters mit Antikörpern gegen TCR β beziehungsweise einem entsprechenden Isotypen, sowie gegen CD8 gefärbt. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt war klar zu erkennen, dass sich die Expression des TCR sowohl auf St35- als auch auf St42-T-Zellen von 8 Wochen alten Tieren nicht von den Werten von 32 Wochen alten Tieren unterschieden. Auch die zu anderen Zeitpunkten gemessenen Werte waren identisch.

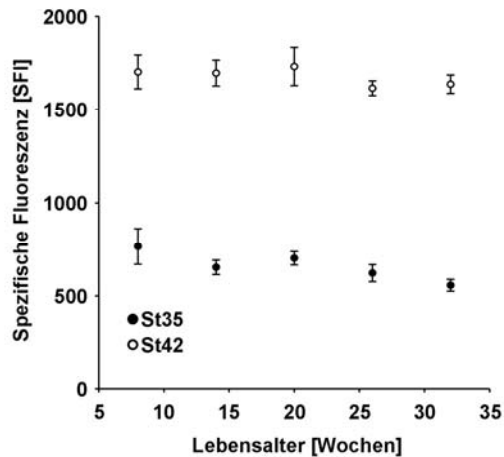


Abbildung 3.9: Die Expression des TCR auf St35- und St42-T-Zellen ist über die gesamte Lebensdauer der Tiere hinweg stabil.

Blutlymphozyten aus St42- (offene Symbole) und St35- (gefüllte Symbole) Mäusen im Alter von jeweils 8, 14, 20, 26 und 32 Wochen wurden mit α -CD8-APC-Cy7- und α -TCR β -PE- beziehungsweise mit α -CD8-APC-Cy7- und einem PE-markierten isotypen Antikörper gefärbt, durchflusszytometrisch analysiert und die spezifische Fluoreszenz für das TCR β -Signal auf CD8⁺PI⁻Lymphozyten berechnet. Angegeben ist jeweils die Standardabweichung aus je 5 Werten.

3.1.4 Die Anzahl transgener T-Zellen in der Peripherie ist in St42-Mäusen etwa 2- bis 3- mal höher als in St35-Mäusen

Da die bisherigen Analysen zwar gezeigt hatten, dass in der Peripherie der St35- und St42-Mäuse ähnlich viele T-Zellen zu finden waren konnte von einer vergleichbar guten Selektion der Thymozyten in St35- und St42-Mäusen ausgegangen werden. Weitere Analysen sollten jedoch detailliertere Informationen über die jeweilige Anzahl an CTLs in der Peripherie der Mäuse liefern. Neben der Selektion im Thymus haben weitere Effekte wie die Homöostatische Proliferation reifer T-Zellen oder Selektionsmechanismen in der Peripherie durch Vermehrung beziehungsweise Reduktion der T-Zellen Einfluss auf die Größe des T-Zellkompartiments. Um solche Effekte abschätzen zu können, wurde die Anzahl der naiven T-Zellen in der Peripherie von St42- und St35-Mäusen über einen längeren Zeitraum untersucht. Naive T-Zellen zirkulieren durch das Blut- und Lymphsystem und verteilen sich in einem gleich bleibenden Verhältnis auf beide Systeme. Um die absolute Anzahl der CD8-Zellen in der Peripherie zu bestimmen müsste zunächst die Gesamtzellzahl sowie der Anteil der CD8 positiven Zellen in der Lymphe, im Blut, in den Lymphknoten und der Milz bestimmt werden, um die Gesamtzahl der T-Zellen zu berechnen. Da sich die Anzahl der Zellen in Blut und Lymphe der Tiere praktisch nicht und in den Lymphknoten nur sehr schwer und ungenau bestimmen lässt, wurde

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

hier lediglich die Anzahl der Zellen in der Milz beider Mausstämme bestimmt und verglichen. Unter Annahme einer konstanten Verteilung auf die genannten Organe sollte dies also die zuverlässigste Methode sein. Es wurde also zunächst die Gesamtzellzahl der Milz bestimmt. Eine durchflusszytometrische Analyse der Milzzellen ergab den Anteil der CD8⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl und erlaubte somit eine Berechnung der absoluten Anzahl von T-Zellen in der Milz. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt, ergab die Analyse von St35- und St42-Mäuse im Alter zwischen 8 und 32 Wochen, dass sich in St42-Mäusen zu allen beobachteten Zeitpunkten etwa 2- bis 3-mal mehr CTLs fanden als in St35-Mäusen. So enthielt die Milz von 8 Wochen alten St42-Mäusen etwa 3,6 Millionen CD8-positive T-Zellen, während in St35-Mäusen gleichen Alters etwa 1,25 Millionen CD8⁺-T-Zellen zu finden waren. Weiterhin war zu beobachten, dass in beiden Fällen die Zahl der T-Zellen mit dem Alter der Tiere zunahm. Dabei war der Anstieg der Zellzahl bis zur 20. Woche vergleichsweise hoch und flachte danach ab, beziehungsweise erreichte einen Maximalwert. In beiden Fällen fand dabei etwa eine Verdoppelung der T-Zellzahl statt, so dass sich in St42-Mäusen etwa 6,5 Millionen und in St35-Mäusen etwa 2,8 Millionen Zellen zählen ließen.

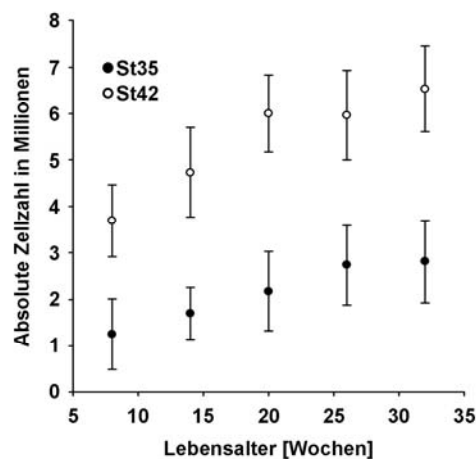


Abbildung 3.10: In den Milzen von St35-Mäusen finden sich etwa 2- bis 3-mal weniger T-Zellen als in den Milzen von St42-Mäusen.

Milzzellen aus St42- (offene Symbole) und St35- (gefüllte Symbole) Mäusen im Alter von jeweils 8, 14, 20, 26 und 32 Wochen wurden mit α -CD8-APC-Cy7-Antikörper gefärbt und der Anteil der CD8⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Daraus wurde mit der Gesamtmilzzellzahl die Zahl der CTLs berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus je 5 Werten.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen dass, beide St-Stämme einen identischen transgenen TCR exprimieren. Dieser resultiert in der Selektion von CD8⁺-

T-Zellen, die durch das Kreuzen des Transgens auf den RAG2^{-/-}-Hintergrund exklusiv das T-Zellkompartiment in der Peripherie der Tiere besetzen. Außerdem wurde durch das Kreuzen mit CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Stämmen das jeweilige Allel im Stamm etabliert und somit eine Unterscheidung der verschiedenen CTL-Klone untereinander, sowie von B6-T-Zellen ermöglicht. Der neue St35-Stamm generiert tatsächlich transgene T-Zellen, die sich in der TCR- Expressionsdichte von den St42-T-Zellen unterscheiden. Phänotypische Analysen lassen einen 2- bis 3-fachen Unterschied in der Expressionsdichte annehmen und bestätigen eine identische Affinität des jeweiligen Rezeptors für den H2-D^b-SGPSNTPPEI-Komplex. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich, abgesehen von der leicht erhöhten Expression des CD8-Moleküls, die niedrigere TCR-Expression in den St35-CTLs nicht in klar detektierbaren Veränderungen weiterer Oberflächenmarker gegenüber den St42-CTLs niederschlägt. Des Weiteren ist die TCR-Expression in St35- und St42-CTLs über die ganze Lebensdauer der Tiere konstant und führt in beiden Fällen zu einer ähnlich effektiven positiven Selektion der Thymozyten, es finden sich in der Peripherie also vergleichbare Zahlen an transgenen T-Zellen.

Abgesehen von der TCR- und CD8-Expression ließen sich also keine phänotypischen Unterschiede zwischen den beiden transgenen T-Zellklonen detektieren.

3.2 Aktivierung der St-CTLs *in vitro*

Nachdem die St-CTLs phänotypisiert wurden, sollten die beiden transgenen T-Zellklone im nächsten Schritt in *in vitro* Experimenten funktionell charakterisiert werden. Hier ließen sich erste Informationen über den Einfluss der TCR-Dichte auf die Funktionalität zytotoxischer T-Zellen sammeln.

3.2.1 St35- und St42-CTLs proliferieren nach Stimulation mit PMA und Ionomycin oder α -CD3- und α -CD28-Antikörper in gleichem Maße

Zunächst sollte in ersten Experimenten die Funktionalität des TCRs überprüft werden. Hierzu sollten die T-Zellen spezifisch über den TCR aktiviert und diese Aktivierung mit der durch unspezifische Stimulation induzierten Aktivierung verglichen werden. Die Aktivierung wurde über 2 Parameter definiert, zum einen sollte die Proliferation der T-Zellen gemessen werden. Hierzu wurde das CFSE-System gewählt, welches

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

anhand der durchflusszytometrischen Analyse der Verdünnung des Farbstoffs die Analyse der Proliferation der Zellen erlaubt. Zum anderen sollte die durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Aktivierungsmarker Rückschlüsse auf die Qualität der Aktivierung der Zellen zulassen. Um die Analyse der Zellen zu erleichtern, wurden die CD8⁺-Zellen mit dem MACS-System aus der Milzzellsuspension angereinigt und dann für die Messung der Proliferation mit CFSE markiert. Die TCR-spezifische Aktivierung der Zellen sollte mit immobilisierten α -CD3- und α -CD28-Antikörpern erfolgen. Im Gegensatz dazu erfolgte die unspezifische Stimulation mit den Mitogenen PMA und Ionomycin.

Das Experiment wurde in 96-Kavitäten-Flachbodenplatten durchgeführt. Die Antikörper wurden zuvor durch Inkubation über Nacht in PBS an die Reaktionsgefäße gebunden. Jeweils 25.000 CD8⁺-CFSE-markierte Zellen aus St35-, St42- beziehungsweise B6-Mäusen wurden in T-Zellmedium in eine Kavität gegeben. PMA und Ionomycin wurden entsprechend zugegeben.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Proliferation der Zellen durchflusszytometrisch anhand der Verminderung des jeweiligen CFSE-Signals bestimmt. Innerhalb der ersten 24 Stunden ließ sich in keiner der Proben Proliferation der T-Zellen detektieren. Wie in Abbildung 3.11 A zu sehen ist, hatten sich nach 48 Stunden die Zellen in allen Proben 1- bis 3-mal geteilt, nach 72 Stunden dann 3- bis 5-mal. Hier ließ sich zum einen erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 analysierten T-Zellarten gab. Außerdem ließen sich keine Unterscheide zwischen den mit den Antikörpern und den, mit den Mitogenen stimulierten Zellen erkennen. Entsprechend eingesetzte isotype unspezifische Antikörper führten, ebenso wie Mitogen-freies T-Zellemedium zu keiner messbaren Proliferation der T-Zellen (nicht gezeigt).

Auch die Messung der Aktivierungsmarker auf den T-Zellen nach 48 (nicht gezeigt) und 72 Stunden zeigte, entsprechend der gemessenen Proliferation, keine Unterschiede zwischen den verschiedenen T-Zellen auf. Wie in Abbildung 3.11 B zu sehen ist, induzierte die PMA/Ionomycin-Stimulation nach 72 Stunden keinen vollständig aktivierten Phänotyp. So war zwar eine Hochregulierung des CD44-Moleküls zu erkennen, es ließ sich dagegen jedoch keine Herunterregulation des CD62L-Moleküls messen. Die Expression des CD25-Moleküls war zu diesem Zeitpunkt auf den meisten Zellen bereits wieder herunterreguliert. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung mit den beiden immobilisierten Antikörpern zu einer

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

vollständigen phänotypischen Aktivierung der T-Zellen. Hier konnte auf allen Zellen ein hohes CD44- und CD25-Signal sowie ein niedriges CD62L-Signal gemessen werden.

Es zeigte sich also, dass sich trotz der oben beschriebenen Unterschiede im Phänotyp der verschiedenen naiven T-Zellen bei TCR-spezifischer, sowie bei unspezifischer Stimulation keine Unterschiede in der Aktivierung der T-Zellen *in vitro* manifestierten.

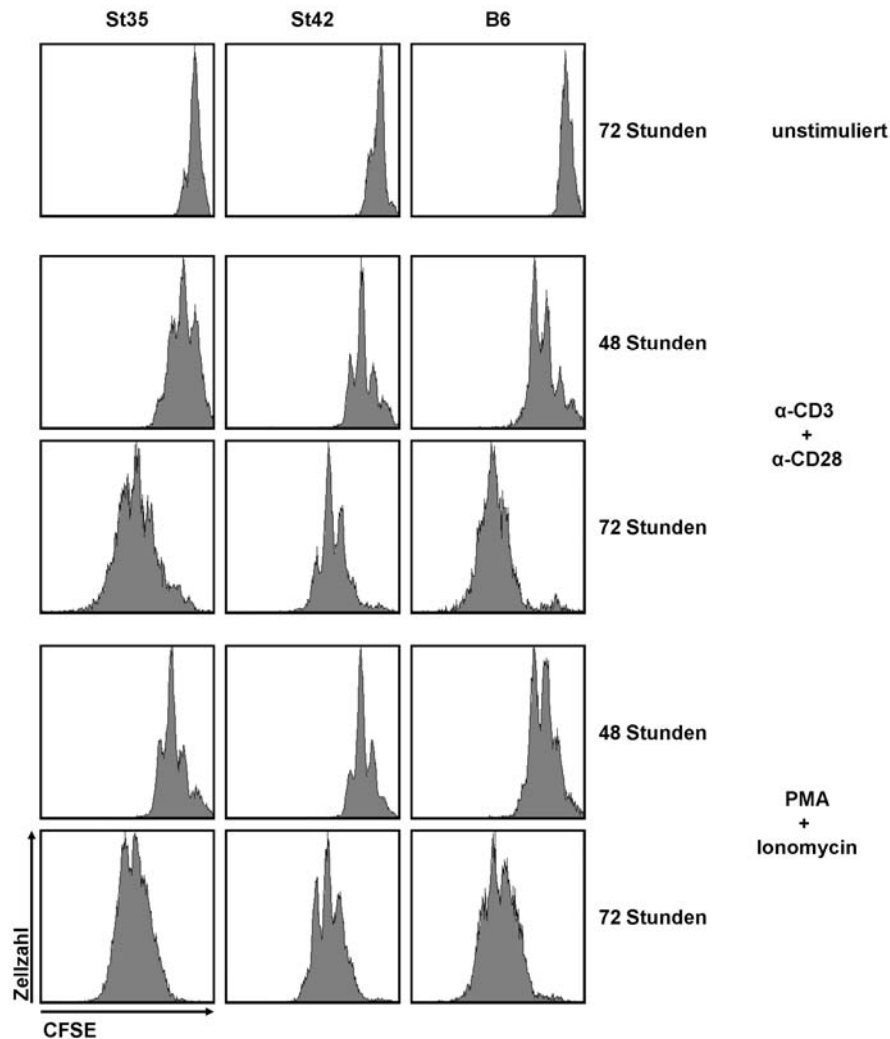


Abbildung 3.11 A: St35-, St42- und B6-T-Zellen proliferieren nach Stimulation mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern sowie mit PMA und Ionomycin in gleichem Maße.

Aus St35-, St42- und B6-Milzen wurden $CD8^+$ -T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit 2,5 μ M CFSE markiert. Jeweils 25.000 $CD8^+$ -T-Zellen wurden in mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern beschichteten Kavitäten (je 0,5 μ g pro Kavität) einer 96-Kavitätenplatte inkubiert, beziehungsweise entsprechend mit PMA (25 ng/ml) und Ionomycin (0,5 μ M) stimuliert.

Nach 48 und 72 Stunden wurden jeweils Proben entnommen, mit einem α -CD8-APC-Cy7-Antikörper gefärbt und das CFSE-Signal auf den $CD8^+PI^-$ -Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Die dargestellten Messungen sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

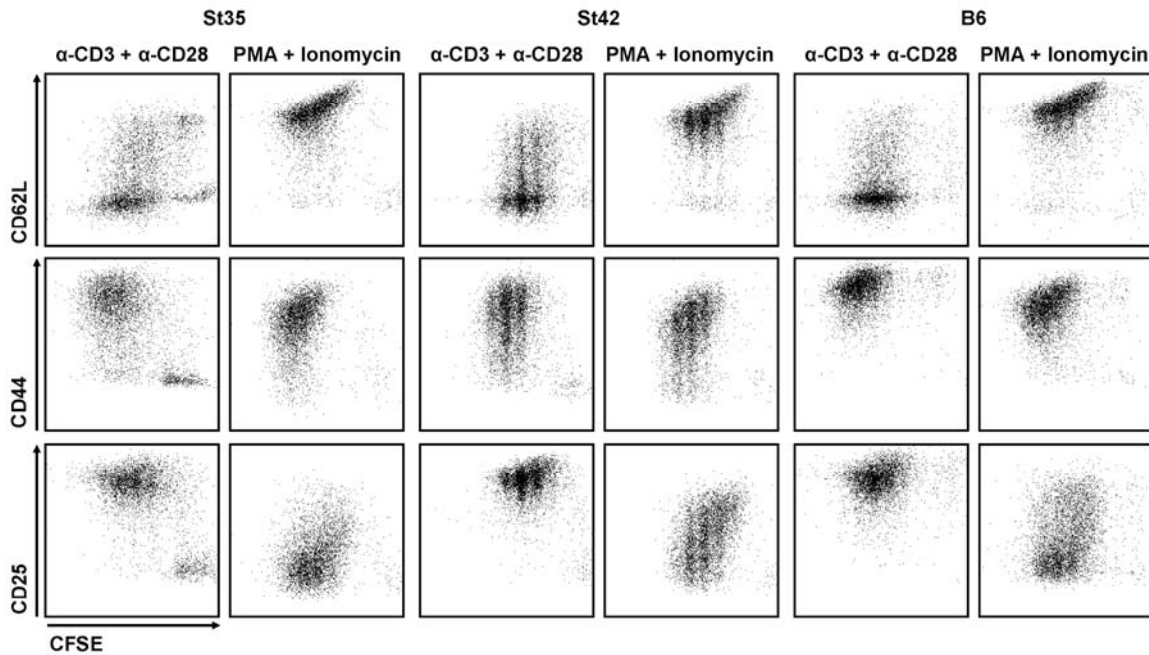


Abbildung 3.11 B: St35-, St42- und B6-T-Zellen proliferieren nach Stimulation mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern sowie mit PMA und Ionomycin in gleichem Maße.

Aus St35-, St42- und B6-Milzen wurden $CD8^+$ -T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit 2,5 μ M CFSE markiert. Jeweils 25.000 $CD8^+$ -T-Zellen wurden in mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern beschichteten Kavitäten (je 0,5 μ g pro Kavität) einer 96-Kavitätenplatte inkubiert, beziehungsweise entsprechend mit PMA (25 ng/ml) und Ionomycin (0,5 μ M) stimuliert.

Nach 72 Stunden wurden jeweils Proben entnommen, mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD62L-PE-, α -CD44-APC-, α -CD25-PE-Cy7-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die entsprechenden Signale im Vergleich zum CFSE-Signal auf $CD8^+PI^-$ -Zellen.

Die dargestellten Messungen sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.2.2 St35- und St42-CTLs zeigen bei Aktivierung mit APCs *in vitro* keine Unterschiede

Um die bisher beschriebenen Erkenntnisse weiter zu verfeinern, sollte die Aktivierung der T-Zellen mit Antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* getestet werden. Hierbei ließ sich der Einfluss der Dynamik der Zell-Zell-Interaktion mitberücksichtigen. So kommt es bei der Interaktion einer APC mit einer T-Zelle unter anderem zur Ausbildung der so genannten Immunologischen Synapse, zur Verstärkung der Zell-Zell-Bindung über Integrine und zur Wechselwirkung einer Vielzahl kostimulatorischer Moleküle. Deren Beitrag zur Aktivierung der T-Zellen konnte, sofern vorhanden, zuvor bei der Antikörperstimulation nicht imitiert werden.

Da eine optimale Stimulation von T-Zellen nur durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen gewährleistet wird, wurden hier *in vitro* generierte Dendritische

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Zellen als APC gewählt. Diese wurden zudem mit dem TLR3-Liganden p(I:C) aktiviert und mit dem SGPSNTPPEI-Peptid beladen bevor sie mit den CFSE-markierten CD8⁺-Zellen kokultiviert wurden.

Bei diesen Experimenten wurden also per MACS angereinigte, CFSE-markierte CTLs aus St35- und St42-Mäusen mit den APCs *in vitro* kokultiviert und die Proliferation der Zellen verfolgt. Wie bereits die Stimulation mit PMA und Ionomycin, beziehungsweise mit α -CD3 und α -CD28 gezeigt hatte, ließ sich die Aktivierung der Zellen durch bloße Betrachtung der Proliferation nicht ausreichend genau untersuchen. Daher wurde auch hier die Regulation diverser Aktivierungsmarker durchflusszytometrisch analysiert. Ein Vergleich mit B6-CTLs war bei diesem experimentellen Ansatz nicht möglich, da der Anteil an SGPSNTPPEI-spezifischen naiven CTLs in B6-T-Zellen zu gering war um die Aktivierung zu verfolgen.

In einem ersten Ansatz sollte bei einem konstanten Verhältnis von APC zu T-Zelle der zeitliche Verlauf der Aktivierung beobachtet werden. Dazu wurden in einer 48-Kavitätenplatte je 50.000 CD8⁺ CFSE-markierte T-Zellen mit 25.000 aktivierten und mit 1 nM SGPSNTPPEI-Peptid-beladenen DCs in T-Zellmedium inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden jeweils Proben zur durchflusszytometrischen Analyse der Proliferation und der Regulation der Aktivierungsmarker entnommen. Betrachtete man zunächst die Proliferation der T-Zellen (Abbildung 3.12), so zeigte sich, dass sich erneut keine Unterschiede zwischen den beiden St-T-Zellklonen erkennen ließen. So teilten sich jeweils die meisten T-Zellen innerhalb der ersten 48 Stunden 2- bis 3-mal, innerhalb der darauf folgenden 24 Stunden fanden weitere 2 bis 3 Teilungen statt. Nach 96 Stunden hatten sich die meisten Zellen dann 6- bis 8-mal geteilt, was der maximalen Teilungsrate entsprach. Innerhalb der ersten 24 Stunden war keine Teilung der T-Zellen zu detektieren, was sich aus einem Vergleich mit T-Zellen ergab, die mit nicht Peptid-beladenen DCs inkubiert wurden (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

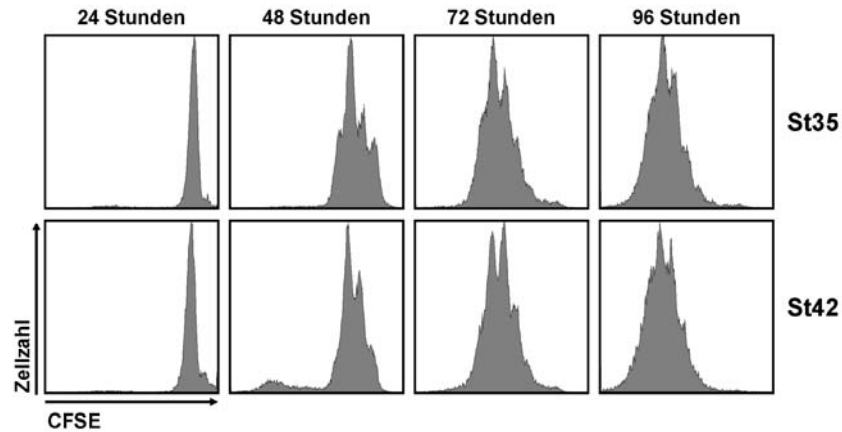


Abbildung 3.12: St35- und St42-T-Zellen zeigen bei Aktivierung mit SGPSNTPPEI-beladenen APCs ein ähnliches Proliferationsverhalten.

Aus St35- und St42-Milzen wurden $CD8^+$ -T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit $2,5 \mu M$ CFSE markiert. Jeweils 50.000 $CD8^+$ T-Zellen wurden in 48-Kavitätenplatten mit 25.000 p(I:C)-aktivierten und mit 1 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDC inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 wurden Proben entnommen, mit einem α -CD8-APC-Cy7-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die CFSE-Signale der jeweiligen $CD8^+PI^-$ -Zellen sind gezeigt. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um repräsentative Einzelanalysen aus einem von 4 unabhängigen Experimenten.

Betrachtet man, wie in Abbildung 3.13 dargestellt, die Analyse der Aktivierungsmarker auf den T-Zellen, so stellte man fest, dass sich auch bezüglich dieser Parameter kein Unterschied zwischen St35- (Abbildung 3.13 A) und St42- (Abbildung 3.13 B) T-Zellen erkennen ließ. So zeigte sich in beiden Fällen, dass, im Vergleich zu nicht mit Peptid-stimulierten T-Zellen (nicht gezeigt) nach 24 Stunden bereits auf fast allen Zellen CD25 und CD69 hoch-, CD62L entsprechend herunterreguliert wurden. Nach 48 Stunden war auch CD44 hochreguliert. Dieser Phänotyp der Zellen ließ sich, abgesehen von einer leichten Herunterregulierung von CD69 und CD25 nach 96 Stunden, zu allen gemessenen Zeitpunkten beobachten.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

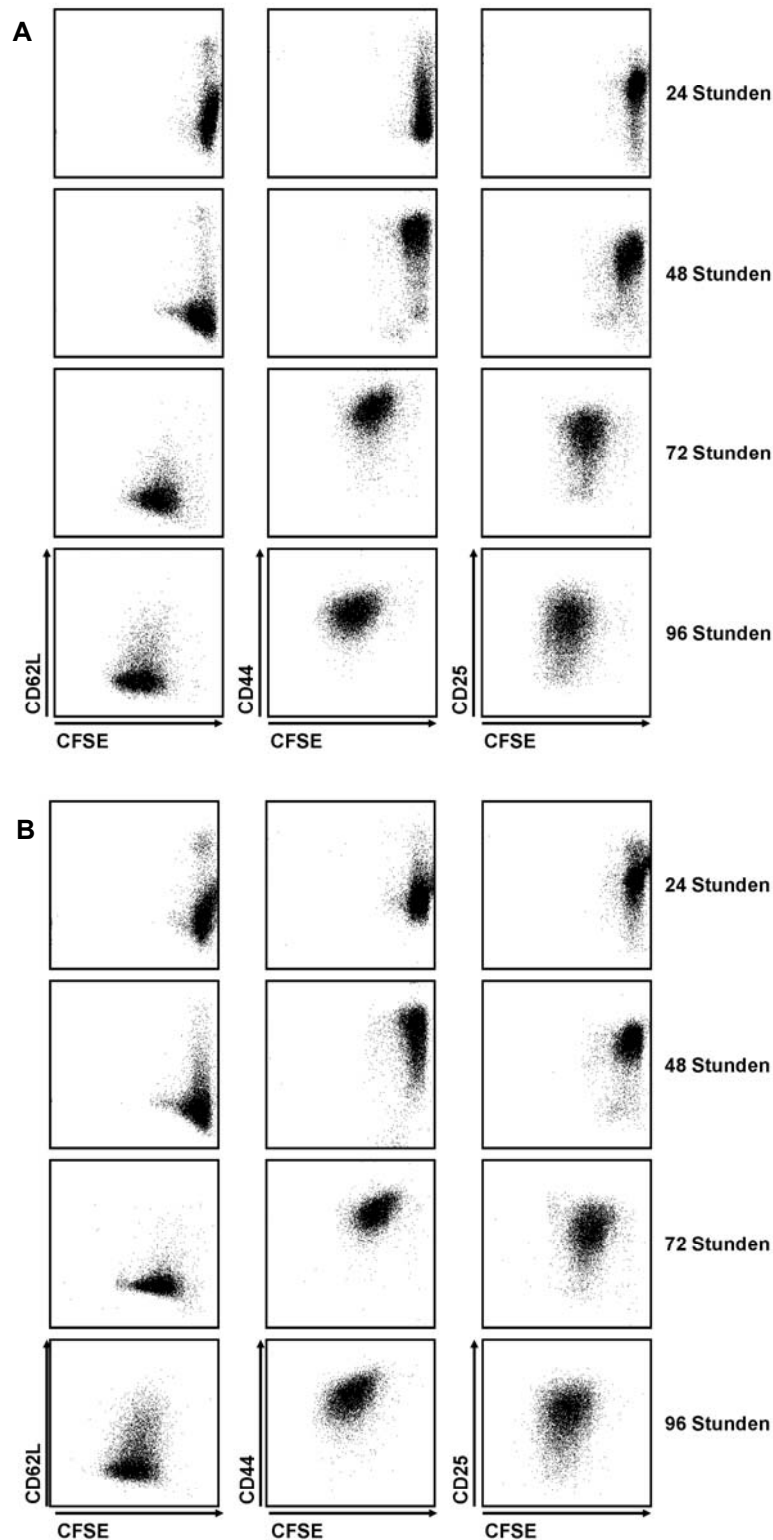


Abbildung 3.13: Die Kinetik der Expression von Aktivierungsmarkern auf St35- und St42-T-Zellen bei Aktivierung mit SGPSNTPPEI-beladenen APCs ist identisch.

Aus St35- (A) und St42- (B) Milzen wurden $CD8^+$ -T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit $2,5 \mu M$ CFSE markiert. Jeweils 50.000 $CD8^+$ -T-Zellen wurden in 48-Kavitätenplatten mit 25.000 p(I:C)-aktivierten und mit 1 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDC inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden jeweils Proben entnommen, mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD62L-PE-, α -CD44-APC-, α -CD25-PE-Cy7-Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die entsprechenden Signale im Vergleich zum CFSE Signal auf $CD8^+PI^-$ -Zellen. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um repräsentative Einzelanalysen aus einem von 4 unabhängigen Experimenten.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Nachdem sich bei diesem Versuchsansatz keine Unterschiede in der Aktivierung erkennen ließen, sollte durch eine Modifikation der Versuchsbedingungen eine weitere Verfeinerung der Analyse erreicht werden. Hier bot sich zunächst die Titration des auf den DCs gebundenen Peptids an. So wurde das oben beschriebene Experiment wiederholt (50.000 CD8⁺-T-Zellen + 25.000 DCs pro Kavität), jedoch wurden die DCs vor der Koinkubation mit den T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des SGPSNTPPEI-Peptids beladen. Hierbei wurde die Konzentration des Peptids jeweils 10-fach von einer Ausgangskonzentration von 10 nM auf 10 pM titriert. Die Zellen wurden nach 72 Stunden durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich (siehe Abbildung 3.14), dass die Proliferation der T-Zellen zwischen 10 nM und 100 pM Peptid-Konzentration praktisch gleich blieb, eine Konzentration von 10 pM dagegen reichte nicht mehr aus, um eine Proliferation der T-Zellen zu induzieren. Wie bereits zuvor beobachtet, konnten auch unter diesen Versuchsbedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden ST-T-Zellen detektiert werden. Entsprechendes galt auch hier für die Expression der Aktivierungsmarker (nicht gezeigt).

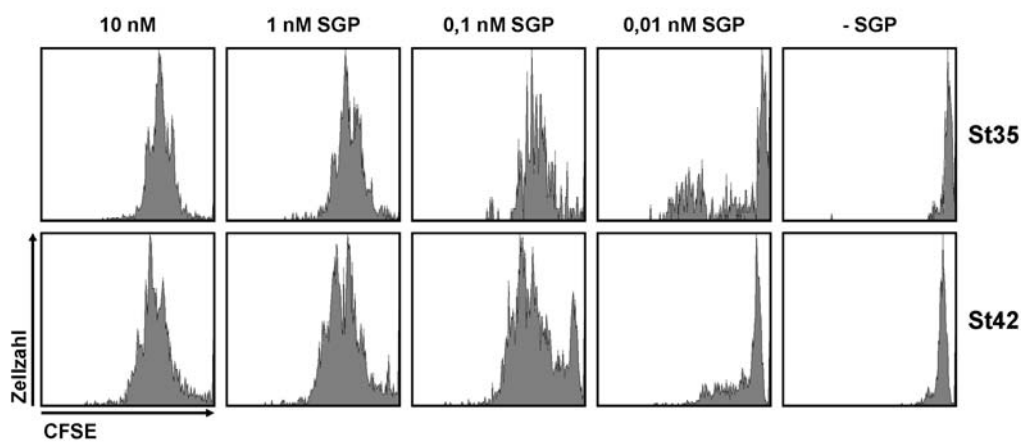


Abbildung 3.14: Die Proliferation von St35- und St42-T-Zellen zeigt die gleiche Abhängigkeit von der SGPSNTPPEI-Konzentration.

Aus St35- und St42-Milzen wurden CD8⁺-T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit 2,5 µM CFSE markiert. Jeweils 50.000 CD8⁺-T-Zellen wurden in 48-Kavitätenplatten mit 25.000 p(I:C)-aktivierten BMDCs inkubiert. Die Beladung der BMDCs erfolgte bei Peptidkonzentrationen von 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM. Nach 72 Stunden wurden Proben entnommen, mit einem α-CD8-APC-Cy7-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die CFSE-Signale der jeweiligen CD8⁺PI⁻-Zellen sind abgebildet. Die dargestellten Einzelwerte repräsentieren 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

In einem letzten Experiment wurde schließlich bei einer konstanten Peptid-Konzentration von 1 nM, die Zahl der DCs zur Aktivierung der T-Zellen titriert. Erneut wurden in einer 48-Kavitätenplatte 50.000 CD8⁺-CFSE-markierte T-Zellen in T-Zellmedium mit DCs inkubiert. Die Anzahl der DCs wurde dabei in 3er Schritten von 100.000 auf 300 pro Kavität titriert. Nach 72 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der CFSE-Verdünnung. Erneut zeigten sich keine signifikanten Unterschieden zwischen den beiden T-Zellklonen (siehe Abbildung 3.15). In beiden Fällen war zu erkennen, dass eine maximale Proliferation der T-Zellen bei 100.000 und 30.000 DCs pro Kavität erreicht wurde. Ab einer Anzahl von 10.000 DC ging die Proliferation der T-Zellen merklich zurück. Mit 3000 DC pro Kavität wurden nur noch wenige T-Zellen ausreichend stimuliert, bei 1000 DCs pro Kavität ließ sich annähernd keine Proliferation mehr messen, schließlich waren 300 DCs nicht mehr ausreichend um zu einer Proliferation der T-Zellen zu führen. Erneut zeigten sich beim Vergleich der Expressionmuster der Aktivierungsmarker auf den T-Zellen keine Unterschiede zwischen den St35- und St42- T-Zellen (nicht gezeigt).

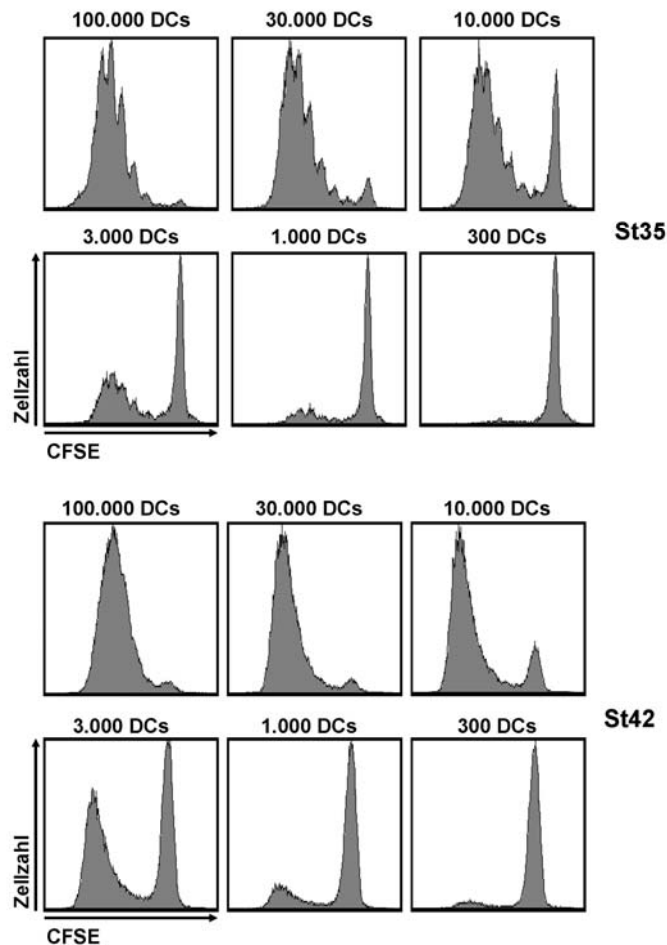


Abbildung 3.15: St35- und St42-CTLs benötigen zur Proliferation ein ähnliche Anzahl an APCs. Aus St35- und St42-Milzen wurden $CD8^+$ -T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt und mit $2,5 \mu M$ CFSE markiert. Jeweils $50.000 CD8^+$ -T-Zellen wurden in 48-Kavitätenplatten mit 100.000, 30.000, 10.000, 3.000 oder 1.000 p(I:C)-aktivierten und mit 1 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDC inkubiert. Nach 72 Stunden wurden Proben entnommen, mit einem α -CD8-APC-Cy7-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die CFSE-Signale der jeweiligen $CD8^+PI^-$ -Zellen sind abgebildet. Die dargestellten Einzelwerte repräsentieren 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Neben der phänotypischen Analyse der aktivierten T-Zellen sind funktionelle Tests der Zellen unerlässlich, um eine Aussage über die vollständige Aktivierung der Zellen treffen zu können. Hierbei ist, neben der antigenspezifischen lytischen Funktionalität der T-Zellen, die spezifische Produktion von IFN- γ essentiell. Dementsprechend sollten hier also aktivierte St35- und St42-Zellen auf eben jene Effektorfunktionen hin untersucht werden.

Dazu wurden jeweils $50.000 St35$ - beziehungsweise $St42-CD8^+$ -T-Zellen zusammen mit jeweils 25.000 mit 1 nM SPG-beladenen DCs pro Kavität in 48-Kavitätenplatten koinkubiert und nach 72 Stunden zur Durchführung der funktionellen Tests geerntet. Die antigenspezifische lytische Kapazität der T-Zellen sollte in einem klassischen ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt werden. Dazu wurden die aktivierten T-Zellen in

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

titrierter Anzahl (3er Schritte) in einer 96 Kavitäten Rundbodenplatte mit je 10.000 Chromat- markierten und SGPSNTPPEI-beladenen (10 nM) EL4-Thymomzellen inkubiert. Um die unspezifische Lyse der EL4-Zellen abschätzen zu können wurde ein entsprechender Ansatz mit ASNENMETM-beladenen EL4-Zellen durchgeführt. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden 50 µl des Zellüberstandes entnommen und die jeweils enthaltene Menge an radioaktiv markiertem Chrom im Trockenzintillationsverfahren mit einem β -Zähler bestimmt. Die Analyse von Zellüberstand von EL4-Zellen, die ohne T-Zellen inkubiert wurden, erlaubte die Bestimmung der spontanen Chromfreisetzung. Dagegen wurde die maximal mögliche Chromfreisetzung durch TritonX-Lyse der EL4-Zellen bestimmt. Diese Werte erlaubten, zusammen mit dem jeweils gemessenen Wert, die Berechnung der relativen spezifischen Lyse der EL4-Zellen. Wie in Abbildung 3.16 A zu sehen ist, vermittelten sowohl St35- also auch St42-CTLs eine sehr geringe unspezifische Lyse der ASNENMETM-beladenen EL4-Zellen. Dagegen war mit beiden T-Zellpopulationen eine effektive spezifische Lyse der SGPSNTPPEI-beladenen EL4-Zellen zu erkennen. In beiden Fällen war bei einem Effektor- zu Zielzellen-Verhältnis von 153:1, 51:1 und 17:1 eine 40 bis 50%ige Lyse der Zielzellen zu beobachten. Bei einem Verhältnis von 6:1 war eine deutlich schlechtere Lyse zu detektieren, die bei einem Verhältnis von 0,5:1 schließlich fast auf den Hintergrund zurückging.

In einem weiteren Ansatz sollte nun mit wie zuvor beschrieben generierten St35- und St42-Effektorzellen deren Fähigkeit peptidspezifisch IFN- γ zu produzieren getestet werden. Als Zielzellen wurden erneut EL4-Zellen gewählt. Von diesen wurden jeweils 10.000 mit 100.000 aktivierten T-Zellen in einer Kavität einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte für 16 Stunden inkubiert. Vor der Inkubation wurden die EL4-Zellen in 10-er Verdünnungsschritten mit SGPSNTPPEI-Konzentrationen von 10 fM bis 1 µM für eine Stunde beladen und anschließend gewaschen. Mittels eines Standard-Sandwich-ELISAs wurde schließlich die IFN- γ -Konzentration in den Zellüberständen gemessen. In Abbildung 3.16 B ist zu sehen, dass auch bezüglich dieses Parameters keine Unterschiede zwischen den St35- und den St42-Effektorzellen zu erkennen waren. So wurden in den Überständen beider T-Zelllinien identische Mengen an IFN- γ gemessen. Es konnte bei SGPSNTPPEI-Konzentrationen von 1 nM und höher jeweils Werte etwa 50 beziehungsweise 60 ng IFN- γ pro ml Zellüberstand detektiert werden. Bei beiden T-Zellklonen ging die Produktion des Zytokins ab einer SGPSNTPPEI-Konzentration von 100 pM zurück und sank bei 1 pM und weniger auf

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

den Hintergrundwert ab. Inkubation der T-Zellen mit ASNENMETM-beladenen EL4 Zellen resultierte in keiner IFN- γ -Produktion der T-Zellen (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse bestätigten vorherige Beobachtungen, die nach Peptid-Restimulation und anschließender durchflusszytometrischer intrazellulärer Zytokin-Analyse mit aus den CFSE-Proliferationsexperimenten hervorgegangenen St35- und St42-Effektor-Zellen gemacht wurden. Dort zeigte sich in allen Experimenten, dass die proliferierten St35- und St42-T-Zellen nach der Aktivierung mit DCs in vergleichbar IFN- γ produzierten (nicht gezeigt).

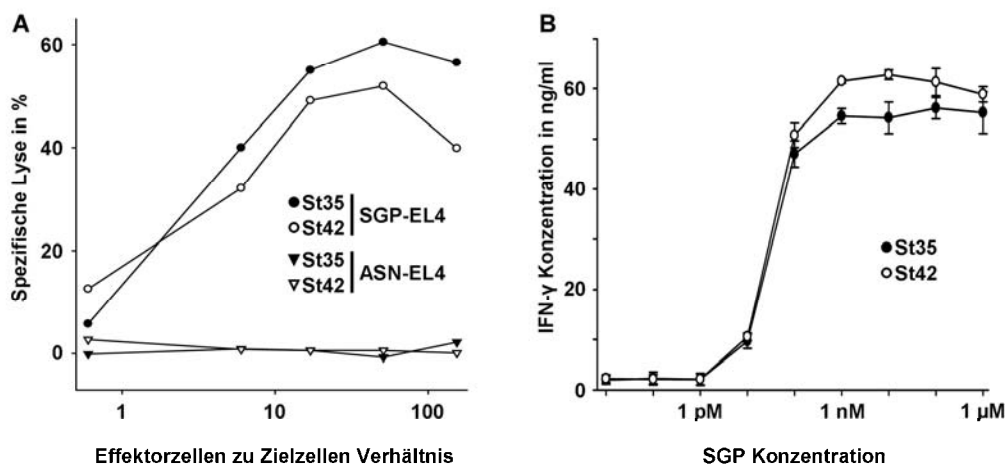


Abbildung 3.16: Aktivierte St35- und St42-CTLs zeigen vollständige Effektorfunktionen.

Aus St35- und St42-Milzen wurden CD8⁺-T-Zellen mit dem MACS-System angereinigt, jeweils 50.000 CD8⁺-T-Zellen wurden in 48-Kavitätenplatten mit 25.000 p(I:C)-aktivierten und mit 1 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs inkubiert. Nach 72 Stunden wurden die aktivierten T-Zellen abgeerntet.

A) Mittels eines 4-Stunden Standard ⁵¹Cr-Freisetzungstests wurde die SGPSNTPPEI-spezifische (Kreise), sowie die unspezifische Lyse (Dreiecke) von Chrom-beladenen EL4-Zellen in Abhängigkeit vom Effektor- zu Zielzellen-Verhältnis durch die aktivierten St35- (offene Symbole) beziehungsweise St42- (gefüllte Symbole) T-Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

B) Die aktivierten St35- (offene Symbole) beziehungsweise St42- (gefüllte Symbole) T-Zellen wurden in 96-Kavitäten Platten jeweils in einem festen Verhältnis mit SGPSNTPPEI-beladenen EL4-Zellen inkubiert. Die EL4-Zellen waren dabei mit titrierten SGPSNTPPEI-Konzentrationen beladen. Nach 16 Stunden wurde die IFN- γ -Konzentration mittels eines Standard ELISA im Zellüberstand bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus 3 Werten. Dargestellt ist eines von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Bezüglich der Aktivierung *in vitro* und der Effektorfunktionen der aktivierten St35- und St42-T-Zellen ließ sich also zusammenfassend feststellen, dass sich, obwohl sich die beiden Klone in der TCR Expression um den Faktor 2 bis 3 unterschieden, keine Unterschiede in der Aktivierung der T-Zellen *in vitro* zeigten. Zudem ließen sich keine Unterschiede in der lytischen Kapazität der St35- und St42-Effektorzellen detektieren.

3.3 Verhalten von St35 und St42 Zellen *in vivo*

Nachdem die *in vitro* Analysen gezeigt hatten, dass sich die TCR-Dichte bei der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen nicht auswirkte, sollte der Einfluss der T-Zellrezeptordichte auf die Aktivierung der Zellen *in vivo* evaluiert werden. Hier spielen neben der Dynamik der Zell-Zell-Interaktion und der Wechselwirkung der kostimulatorischen Moleküle weitere Größen eine Rolle. So können sich unter anderem komplexe, dreidimensionale Strukturen in den verschiedenen Organen, Chemokingradienten, Integrine, Wanderungsverhalten der Zellen, sowie Einflüsse verschiedener anderer Zellen, wie z. B. Th1 oder T_{reg} auf die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen auswirken.

Um unter möglichst realistischen Bedingungen zu arbeiten, wurde hierfür ein Adoptiv Transfer-Modell gewählt. Die transgenen T-Zellen aus den RAG2^{-/-}-Mäusen wurden hierzu in kongene Wild-Typ-Mäuse transferiert die über alle Komponenten des Immunsystems verfügten und vollständig ausgebildete sekundäre lymphatische Organe besaßen. Das CD45- beziehungsweise CD90-System erlaubte hierbei eine zuverlässige Unterscheidung der transferierten transgenen T-Zellen von den endogenen Zellen des Wirtstieres.

3.3.1 St35- und St42-CTLs zeigen nach Aktivierung *in vivo* ein ähnliches Verhalten

Zuerst sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße sich die transgenen Zellen *in vivo* aktivieren ließen. Hierzu wurden jeweils 60.000 transgene CD8⁺-Milzzellen aus St35-, beziehungsweise St42-Mäusen adoptiv in B6-Mäuse transferiert. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte durch i.p. Injektion von 1.000.000 p(I:C)-aktivierten, mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen DCs. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milz sowie die mesenterialen Lymphknoten entnommen, zu Einzelsuspensionen verarbeitet und nach einer hypotonen Erythrozytenlyse zur durchflusszytometrischen Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Analyse erlaubte über Antikörper gegen CD8 und CD90.1 beziehungsweise CD45.1 zum einen den Anteil der transgenen T-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population zu bestimmen, zum anderen konnte der Aktivierungszustand der T-Zellen über eine zusätzliche Färbung mit Antikörpern gegen CD44 und CD62L bestimmt werden.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

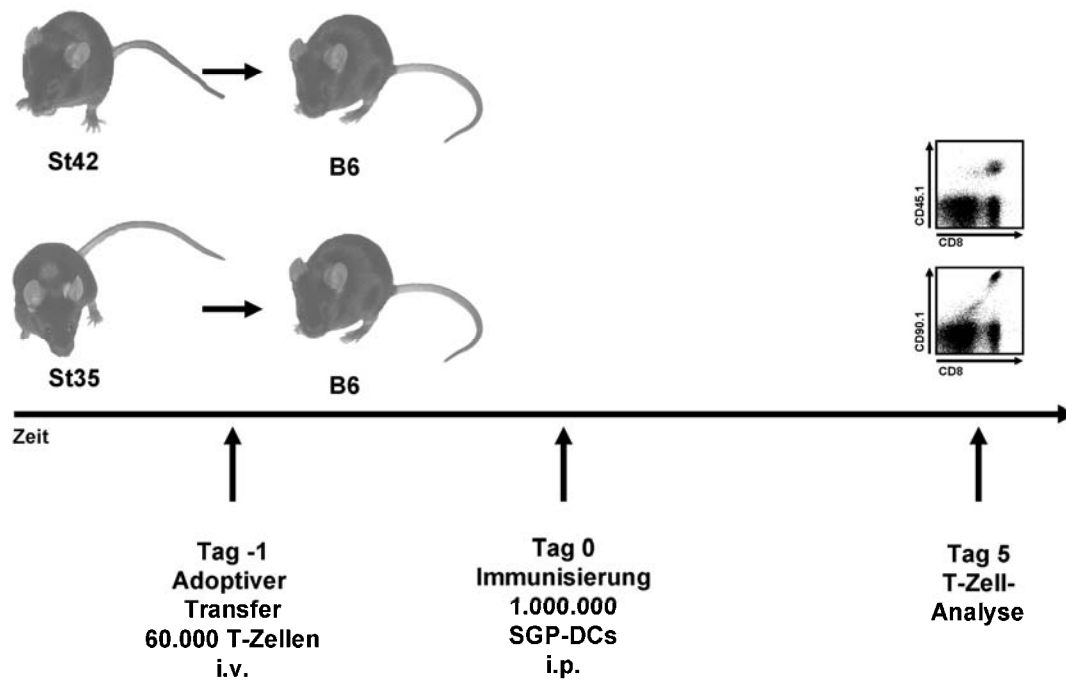


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs beim adoptiven Einzeltransfer

Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, ließen sich nach adoptivem Transfer der St35- und St42-T-Zellen und anschließender Immunisierung mit DCs sowohl in der Milz, als auch in den Lymphknoten transgene T-Zellen mit einem überwiegend aktivierten Phänotyp nachweisen. Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen ließ sich hier ein Unterschied in der Antwort der beiden verschiedenen T-Zellklone nachweisen. Es war deutlich zu erkennen, dass der Anteil der St42-T-Zellen nach der Immunisierung höher ausfiel als der der St35-T-Zellen. Dementsprechend fanden sich in der Milz 13,3 % St35- beziehungsweise 22,4 % St42-CD8⁺-T-Zellen. In den Lymphknoten lag der Anteil der transgenen CD8⁺-T-Zellen bei 3,76 % (St35) und 6,37 % (St42). In nicht immunisierten Tieren lag der Anteil der transgenen T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten deutlich unter 0,1 % (nicht gezeigt). Trotz der Unterschiede in der Anzahl der transgenen T-Zellen war der Aktivierungszustand beider Klone 5 Tage nach der Immunisierung zumindest phänotypisch vergleichbar. Entsprechende Ergebnisse ergaben sich aus den Analysen der Blutlymphozyten der Tiere (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

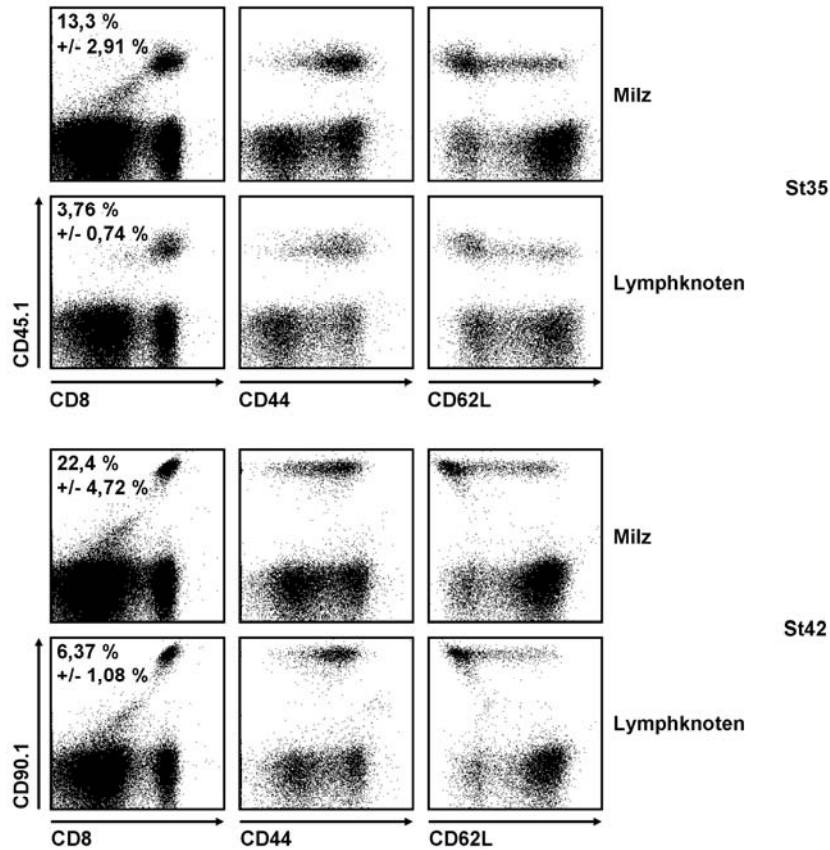


Abbildung 3.18: St35- und St42-T-Zellen expandieren nach Aktivierung *in vivo* in unterschiedlichem Ausmaß

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen und Lymphknoten aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC-, α -CD90.1-PerCP-, α -CD62L-PE- und α -CD44-APC-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. In den jeweils linken Graphen sind die Signale für CD8 und CD45.1 beziehungsweise CD90.1 der Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die mittleren und rechten Graphen zeigen die Signale für CD44 beziehungsweise CD62L gegen CD45.1 beziehungsweise CD90.1 auf den CD8⁺-Lymphozyten. Die abgebildeten Einzelmessungen sind repräsentativ für 6 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

In einem nächsten Experiment sollte der zeitliche Verlauf der Antwort beider Klone gemessen werden. So wurden je 60.000 transgene CD8⁺-T-Zellen in B6-Mäuse transferiert und die Tiere mit 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM), p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. Den Tieren wurde ab dem vierten Tag an verschiedenen Tagen nach der Immunisierung Blut abgenommen und der Anteil der transgenen T-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺-T-Zellen im Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist ergab sich für beide transgene T-Zellklone der gleiche zeitliche Verlauf der Antwort. So waren

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

bei beiden Klonen bereits 4 Tage nach der Immunisierung Zellen im Blut zu detektieren. Nach 5 Tagen erreichte die Antwort ihren Höhepunkt und flachte dann wieder ab. Bereits nach 12 Tagen erreichte der Anteil der transgenen T-Zellen einen Wert, der sich im Verlaufe der darauf folgenden 4 Wochen nicht wesentlich veränderte. Wie bereits zuvor beobachtet, zeigte sich auch hier, dass der Anteil der St35-T-Zellen deutlich geringer ausfiel. Diese Differenz war zu allen gemessenen Zeitpunkten zu beobachten. So erreichte der Anteil der St42-T-Zellen im Blut einen maximalen Wert von 25,0 %, während der Anteil der St35-Zellen lediglich bis zu 20,1 % am fünften Tag nach der Immunisierung anstieg. Nach 40 Tagen ließen sich entsprechend 1,52 % beziehungsweise 0,62 % messen.

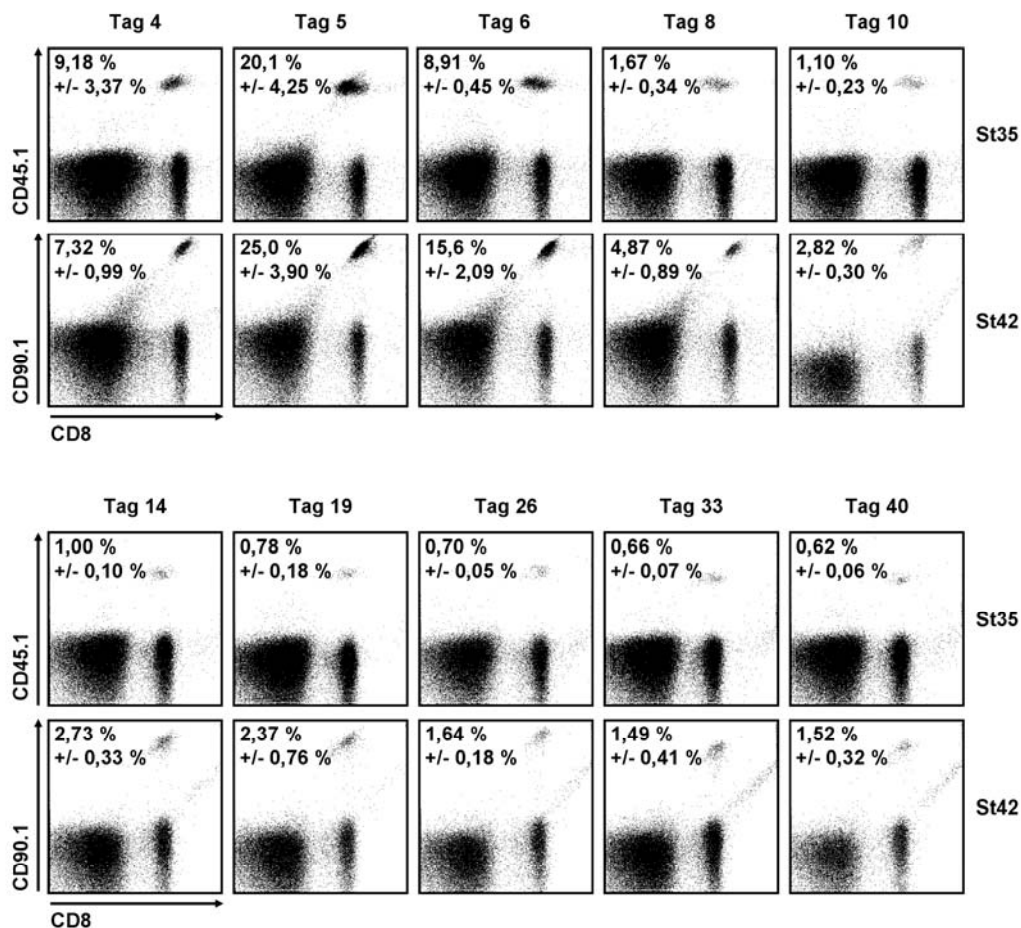


Abbildung 3.19: Die St35- und St42-*in vivo* Antworten zeigen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. An verschiedenen Tagen nach der Immunisierung wurden den Tieren Blutproben zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten entnommen. Die Zellen wurden mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern gefärbt. Die Diagramme zeigen für den jeweiligen Tag nach der Immunisierung die Signale von CD8 gegen CD45.1 beziehungsweise CD90.1 auf PI-Lymphozyten. Die Zahlen indizieren den Anteil der CD45.1-beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺PI⁻-Population sowie die Standardabweichung aus 3 Werten. Dargestellt sind repräsentative Einzelanalysen aus einem von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

In Anbetracht der Tatsache, dass die Antwort im St35-Transfer deutlich schwächer ausfiel als die St42-Antwort, die Zellen jedoch in beiden Fällen einen aktivierten Phänotyp zeigten, sollten im nächsten Schritt die Effektorfunktionen der aktivierten T-Zellen getestet werden. Neben der zytotoxischen Funktion der T-Zellen sollte, um eine definierte Aussage über deren Aktivierungszustand treffen zu können, auch die IFN- γ -Produktion der Zellen überprüft werden.

Hierzu wurden B6-Mäuse mit 60.000 transgenen St35- beziehungsweise St42-T-Zellen adoptiv transferiert und wie oben beschrieben, mit Peptid-beladenen, aktivierten DCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung der Mäuse wurde die lytische Aktivität der T-Zellen mittels eines *in vivo* Zytotoxizitätstest analysiert. Dazu wurden Milzzellen aus B6-Mäusen isoliert, in 2 gleich große Aliquots aufgeteilt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an CFSE markiert. Ein Aliquot wurde zunächst mit 4 μ M CFSE markiert und anschließend für eine Stunde mit 1 μ M SGPSNTPPEI beladen, das andere Aliquot wurde mit 0,4 μ M CFSE markiert und nicht mit Peptid beladen. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen 3-mal gewaschen, die Zellzahl beider Populationen ermittelt, die Zellen in einem 1:1 Verhältnis gemischt und eine Gesamtzahl von 20.000.000 Zellen den zu testenden Tieren i.v. appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurden die Tiere getötet, die Milz entnommen, zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und nach der Erythrozytenlyse direkt durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde das Verhältnis der beiden CFSE-positiven Populationen bestimmt. Sollten in den jeweiligen Tieren funktionelle T-Zellen vorhanden sein, sollten diese von den injizierten Zellen die Peptid-beladenen Zellen spezifisch eliminieren. Eine solche Zelllyse würde also das Verhältnis der beiden CFSE-positiven Zellzahlen verändern. Um das Ausgangsverhältnis der entsprechenden Zellzahlen zu ermitteln wurden die CFSE-markierten Zellen in unbehandelte Mäuse injiziert. Hier konnte dann bestimmt werden, in welchem Zahlenverhältnis sich die beiden Zellpopulationen in der Milz wieder finden wenn keine spezifische Lyse stattfand. Anhand der Zahlenverhältnisse in den nicht immunisierten Mäusen ließ sich also die spezifische Lyse in den immunisierten Mäusen berechnen. Wie in Abbildung 3.20 A zu sehen ist wurden innerhalb der 16-stündigen Inkubation der markierten Zellen in den Immunisierten Mäusen sowohl im St35- als auch im St42-Transfer annähernd 100 % der Peptid-beladenen Zielzellen lysiert (St35: 97,5 %, St42: 98,7 %). Entsprechend ließ sich in Mäusen, die zwar adoptiv transferiert, jedoch nicht immunisiert wurden, keine

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

spezifische Lyse der Zielzellen detektieren (nicht gezeigt). Es wurde also mit diesem Test kein funktioneller Unterschied zwischen den beiden T-Zellklonen beobachtet. In einem weiteren Experiment sollte die IFN- γ -Produktion der T-Zellen überprüft werden. Dazu wurden St35- und St42-T-Zellen wie zuvor in B6-Mäuse transferiert und die Tiere mit Peptid-beladenen DCs immunisiert. Fünf Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet, die Milzen entnommen und präpariert. Um die IFN- γ -Produktion der T-Zellen zu induzieren, wurden die Zellen *ex vivo* mit SGPSNTPPEI stimuliert. Dazu wurden jeweils 1.000.000 Milzzellen pro Kavität in einer 96-Kavitätenplatte mit 100 nM SGPSNTPPEI Peptid und 1 μ g/ml Brefeldin A für sechs Stunden inkubiert. Einer entsprechenden Negativkontrolle wurde lediglich Brefeldin A zugesetzt. Das Brefeldin A inhibiert die Sekretion des produzierten IFN- γ , so dass dieses nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse angefärbt werden konnte. Die Zellen wurden dementsprechend nach der Peptidinkubation zunächst mit Antikörpern gegen CD8 und CD90.1 beziehungsweise CD45.1 gefärbt, fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen IFN- γ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 3.20 B zu sehen ist, produzierten sowohl St35- als auch St42-T-Zellen nach der *ex vivo* Peptid-Restimulation IFN- γ . So zeigten 22,7 % der St35-T-Zellen und 25,7 % der St42-T-Zellen ein positives Signal für IFN- γ . In den lediglich mit Brefeldin A-behandelten Zellen war entsprechend kein IFN- γ -Signal zu messen.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

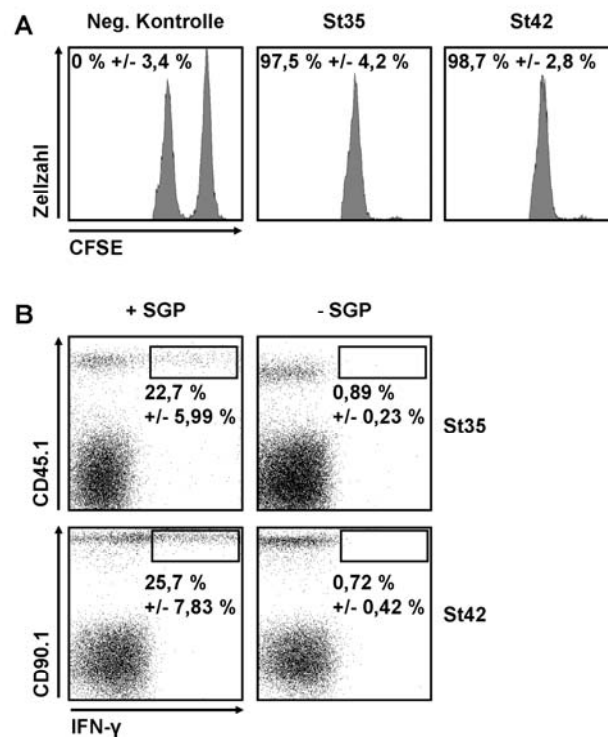


Abbildung 3.20: Sowohl *in vivo* aktivierte St35- als auch St42-T-Zellen sind funktionell.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert.

A) 5 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard *in vivo* Zytotoxizitätstest überprüft. 16 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die CFSE Signale aus einer nicht immunisierten, sowie nach St35- beziehungsweise St42-Adoptiv-Transfer immunisierten Mäusen. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Dargestellt sind repräsentative Einzelanalysen aus einem von 2 Experimenten mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

B) 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und für 6 Stunden mit beziehungsweise ohne SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α -CD8-PE-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN- γ - und CD45.1-beziehungsweise CD90.1-Signal auf CD8⁺-Lymphozyten mit beziehungsweise ohne vorherige Peptid-Restimulation. Die Zahlen geben den Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen sind repräsentativ für 6 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

Die Analyse der aktivierten St35- und St42-T-Zellen nach der Immunisierung mit DCs *in vivo* zeigte, dass, abgesehen von der Anzahl der T-Zellen nach der Immunisierung keine Unterschiede zwischen den beiden T-Zellklonen zu detektieren waren. Sowohl die St35- als auch die St42-T-Zellen zeigten einen aktivierten Phänotyp, lysieren spezifisch Peptid-beladene Zielzellen und produzieren nach *ex vivo* Peptid-

Restimulation etwa die gleichen Mengen an IFN- γ . Im Folgenden sollte nun die *in vivo* Antwort der St-T-Zellen detaillierter untersucht werden.

3.3.2 Die Proliferation der St-CTLs *in vivo* hängt von der Anzahl der APCs ab

Wie zuvor bei den *in vitro* Assays wurde auch hier die Antwort unter limitierenden Bedingungen untersucht. Es wurde mit titrierten Zahlen von DCs immunisiert. Dafür wurden wie zuvor B6-Mäuse mit 60.000 CD8⁺ St35- beziehungsweise St42-T-Zellen adoptiv transferiert und mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten, 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen DCs i.p. immunisiert. Nach fünf Tagen wurde die transgene T-Zellantwort in der Milz der Tiere durchflusszytometrisch analysiert. Neben der zur phänotypischen Analyse direkt durchgeführten Färbung der Zellen auf CD8, CD45.1, CD90.1, CD44 und CD62L wurde zur funktionellen Analyse eine *ex vivo* Peptid-Restimulation der Zellen mit anschließender intrazellulärer Zytokin-Analyse auf IFN- γ durchgeführt. In Abbildung 3.21 ist zu erkennen, dass sowohl im St35- als auch im St42-Transfer der Anteil der transgenen T-Zellen mit abnehmender Anzahl der zur Immunisierung verwendeten Zellen zurückging. So betrug der Anteil der St35-T-Zellen in der Milz nach Immunisierung mit 1.000.000 DCs 15,7 %. Mit 12,3 % (300.000 DCs), 11,9 % (100.000 DCs) und 11,8 % (30.000 DCs) wurden über einen großen Bereich hinweg ähnliche Werte gemessen, erst bei einer Immunisierung mit 10.000 DCs ging der Anteil der ST35-T-Zellen merklich auf 4,27 % zurück. Betrachtete man dagegen die Werte aus dem St42-Transfer, so ergab sich bei Immunisierungen mit hohen DC-Zahlen ein Anteil an transgenen T-Zellen von 21,8 % beziehungsweise 25,4 %. Dieser sank über 15,3 % (100.000 DCs) beziehungsweise 12,0 % (30.000 DCs) schließlich auf 8,15 % ab.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

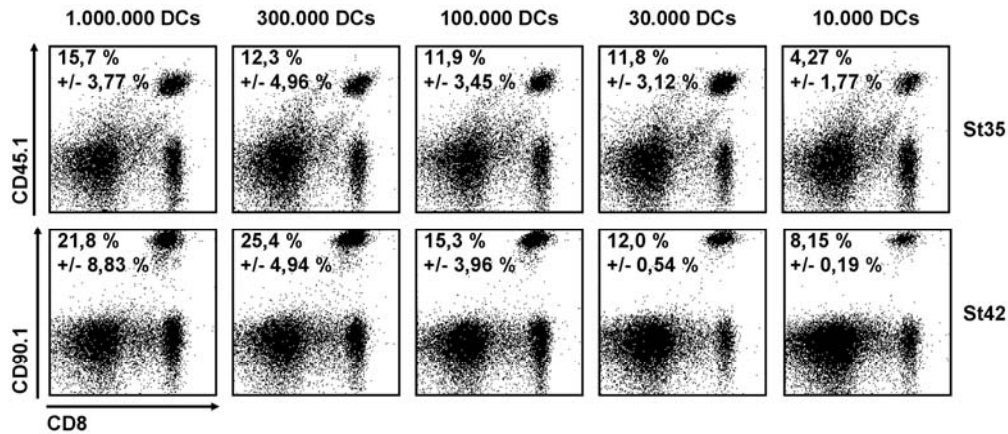


Abbildung 3.21: Die Expansion der St35- und St42-T-Zellen hängt jeweils von der Anzahl der zur Immunisierung verwendeten DCs ab.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDC i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD45.1 beziehungsweise CD90.1 der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

Bei der Analyse des Anteils der T-Zellen in der Milz galt es hier zu beachten, dass sehr große Mengen an transgenen T-Zellen auftreten, die die Menge der in der Milz vorhandenen T-Zellen deutlich verändern können. Deshalb kann die bloße Angabe des Anteils der transgenen T-Zellen an der Gesamtheit der CD8-positiven Zellen mit einem großen Fehler behaftet sein. Zudem kann die Anzahl der Milzzellen von Tier zu Tier stark variieren, was die Genauigkeit dieser Angabe zusätzlich verschlechtert. Aus diesem Grund wurde anhand der durchflusszytometrischen Daten der Anteil der transgenen T-Zellen an der Gesamtmilzzellzahl bestimmt. Zusammen mit der Bestimmung der absoluten Milzzellzahl durch Auszählen der Zellsuspensionen in einer Neubauer Zählkammer konnte also die absolute Zahl der transgenen T-Zellen in der Milz der Tiere bestimmt werden. So zeigte sich, dass eine Immunisierung mit hohen DC-Zahlen das Anwachsen der St35-Zellpopulation auf 1,41 Millionen (1.000.000DCs) beziehungsweise 1,01 Millionen (300.000 DCs) Zellen zur Folge hatte. 100.000 DCs ergaben entsprechend 1,09 Millionen, 30.000 DCs 0,62 Millionen und 10.000 DCs 0,50 Millionen St35-T-Zellen. Entsprechend der Analyse des relativen Anteils der St-T-Zellen ergab auch diese Analyse dass die Population der St42-T-Zellen deutlich größer war als die der St35-T-Zellen, so fanden sich nach der

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

DC Immunisierung 2,54 Millionen (1.000.000 DCs), 2,80 Millionen (300.000 DCs), 1,73 (100.000 DCs), 1,06 Millionen (30.000 DCs) und 0,81 Millionen (10.000 DCs) St42-T-Zellen in den Milzen der Mäuse.

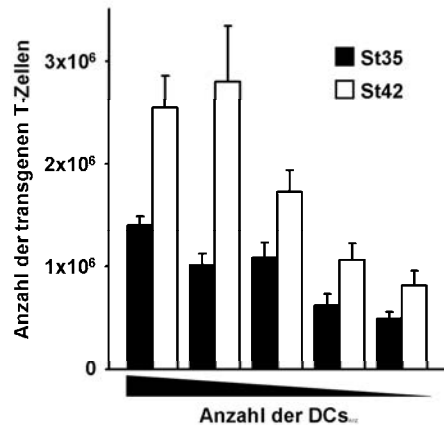


Abbildung 3.22: St35-T-Zellen zeigen *in vivo* eine geringere Expansion als die St42-T-Zellen.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und die Gesamtzellzahl ermittelt. Eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen mit Antikörpern gegen CD8, CD45.1 und CD90.1 erlaubte die Bestimmung des Anteils der transgenen T-Zellen an der Gesamtzellzahl und damit die Berechnung der absoluten Anzahl der in der Milz enthalten transgenen T-Zellen. Gezeigt sind die gemittelten transgenen T-Zellzahlen aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe. Die eingezeichneten Fehler geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Betrachtete man den Phänotyp der T-Zellen, so zeigte sich, dass unabhängig von der Menge der verwendeten DCs alle transgenen T-Zellen einen aktivierten Phänotyp, also hohe CD44- und niedrige CD62L-Expression aufwiesen (nicht gezeigt). Im Einklang mit diesen Daten und den zuvor gemachten Beobachtungen bescheinigte die Analyse der IFN- γ -Produktion der transgenen Zellen (Abbildung 3.23), dass alle analysierten Zellen in gleichem Maße das Zytokin produzierten. So ließ sich durchgehend ein Wert zwischen etwa 14,7 bis 23,2 % IFN- γ -produzierender St35-T-Zellen beziehungsweise 21,9 bis 29,4 % IFN- γ produzierender St42-T-Zellen messen.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

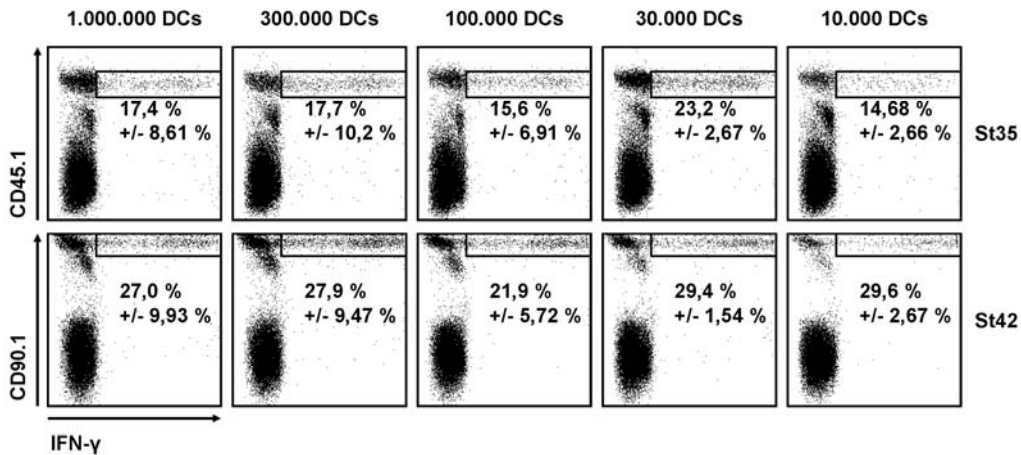


Abbildung 3.23: Die Funktionalität der St35- und St42-T-Zellen hängt nicht von der Anzahl der zur Immunisierung verwendeten DCs ab.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und für 6 Stunden mit SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α-CD8-PE-, α-CD45.1-FITC- und α-CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α-IFN-γ-APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN-γ- und CD45.1- beziehungsweise CD90.1- Signal auf CD8⁺-Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN-γ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

Wurde im Gegensatz zu titrierten Zahlen von DCs eine konstante Zahl von DCs (1.000.000) zur Immunisierung verwendet, auf denen jedoch das Peptid titriert wurde (0,1 nM bis 10 μM), so ergab sich die gleiche Beobachtung. Der Transfer mit St35-T-Zellen und anschließender Immunisierung resultierte wie zuvor beobachtet in einer niedrigeren Zellzahl als beim Transfer der St42-T-Zellen. Es zeigte sich jedoch erneut, dass St35- und St42-Zellen abgesehen davon dieselbe Antwort zeigten. So reichte bei beiden T-Zellklonen eine Konzentration von 1 nM SGPSNTPPEI nicht mehr aus um zu einer Proliferation und Aktivierung der T-Zellen zu führen (nicht gezeigt). Wieder zeigten alle detektierten T-Zellen einen aktivierten Phänotyp und produzierten nach Restimulation IFN-γ.

Hier lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass sich St35 und St42 T-Zellen auch *in vivo* sehr ähnlich verhalten, beide T-Zellklone proliferieren nach Immunisierung mit Peptid-beladenen, aktivierten DCs im Adoptiv-Transfermodell. Dabei unterscheiden sich die beiden Klone jedoch im Umfang der induzierten Antwort. St42-T-Zellen zeigen eine deutlich stärkere Expansion als die St35-T-Zellen. Es zeigt sich, dass sich die erhaltenen Zellen weder phänotypisch noch funktionell

voneinander unterscheiden. Außerdem verändert sich der Umfang der Expansion beider T-Zellklone in gleichem Maße bei Variation der Anzahl der APC und der Menge des spezifischen Antigens.

3.4 Konkurrenz von St-Zellen

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte die Konkurrenz von T-Zellen um Antigen als einer der Mechanismen, die die Immundominanz verursachen, identifiziert werden. Die bisher publizierten Daten beruhen jedoch auf Adoptiv-Transfermodellen, bei denen relativ große Mengen an hochaffinen transgenen T-Zellen in Wild-Typ-Mäuse übertragen werden und die entsprechende endogene Antwort unterdrücken (Kedl et al., 2003; Probst et al., 2003). Entsprechend lassen diese Studien keine Rückschlüsse auf den Einfluss der Vorläuferfrequenz auf die T-Zell-Konkurrenz zu. Zudem konnte keine Aussage über den Phänotyp und die Funktionalität der in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen gemacht werden. Entsprechende Experimente sollten nun mit dem hier etablierten St35/42-Modell durchgeführt werden, da es den Vergleich zweier, abgesehen von der TCR Dichte, nahezu identischer T-Zellklone erlaubt. Der adoptive Transfer der T-Zellen erlaubt zudem die Kontrolle der Vorläufer-Frequenzen der T-Zellen. Im Folgenden sollte also das St-Modell angewendet werden, um der Frage nachzugehen, ob CD8⁺-Zellen um APCs konkurrieren.

3.4.1 St-Zellen zeigen *in vitro* keine Konkurrenz

Um eine Konkurrenz der St-Zellen zu untersuchen, wurden zunächst *in vitro* Versuche durchgeführt. Hierbei wurden St35- und St42-T-Zellen mit CFSE markiert und jeweils zusammen und getrennt mit DCs analog der oben beschriebenen *in vitro* Versuche inkubiert. Hierbei wurden, wie oben bereits beschrieben, die zur Aktivierung verwendeten DCs, sowie die Konzentration des Peptids auf den DC variiert. Zudem wurde in den Kokulturen der beiden T-Zellklone das Mengenverhältnis der T-Zellen titriert. Es zeigte sich jedoch in keinem der durchgeführten Experimente ein Anzeichen von Konkurrenz der T-Zellen untereinander. So zeigten kokultivierten T-Zellen stets die gleiche Proliferation, Aktivierung und Funktion wie die Zellen die separat mit den DCs inkubiert wurden (nicht gezeigt). Es ließen sich also in den *in vitro* Experimenten keine Bedingungen finden, unter denen sich die St-T-Zellen in ihrer Aktivierung gegenseitig beeinflussten.

3.4.2 Endogene CTLs werden nach adoptivem Transfer von St-CTLs nicht aktiviert

In den bisher beschriebenen Wettbewerbsmodellen wurde beobachtet, dass die transferierten transgenen T-Zellen jeweils die endogene Antwort derselben Spezifität annähernd vollständig unterdrückten (Kedl et al., 2000; Probst et al., 2003). Es sollte also zunächst überprüft werden, ob sich dieselben Beobachtungen auch im St-Modell machen ließen, ob also die transferierten St-Zellen mit den endogenen SGPSNTPPEI-spezifischen T-Zellen um das Antigen konkurrieren und deren Antwort unterdrücken. Hierzu wurden jeweils 60.000 St35- beziehungsweise St42-T-Zellen in B6-Mäuse transferiert und diese mit 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM), p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde mittels einer Durchflusszytometrischen Analyse der Blutlymphozyten der Anteil der endogenen SGPSNTPPEI-spezifischen CD8⁺-T-Zellen bestimmt. Hierfür wurden die entnommenen Blutproben zunächst einer hypotonen Erythrozytenlyse unterzogen und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD8, CD45.1 beziehungsweise CD90.1, CD44, CD62L und einem SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX gefärbt und gemessen. Der DimerX erlaubte die Analyse des Anteils der SGPSNTPPEI-spezifischen Zellen an den nicht transgenen CD8⁺-T-Zellen. Wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist resultiert die entsprechende DC Immunisierung in B6 Mäusen ohne adoptiv transferierte T-Zellen in einem Anteil von 2,34 % SGPSNTPPEI-spezifischen T-Zellen, diese zeigten alle eine hohe CD44-Expression sowie eine niedrige CD62L-Expression (nicht gezeigt). Im Vergleich dazu ließen sich in den Mäusen die vor der Immunisierung mit St35- oder St42-T-Zellen adoptiv transferiert wurden, mit gemessenen Werten von 0,21 % und 0,15 % keine endogenen SGPSNTPPEI-spezifischen T-Zellen nachweisen. Hier entsprach der Wert dem der nicht immunisierten Kontrolle von 0,18 % (nicht gezeigt). Es ließ sich also feststellen, dass auch im St-Modell der Transfer der transgenen T-Zellen zum vollständigen Verlust der endogenen CTL-Antwort führte.

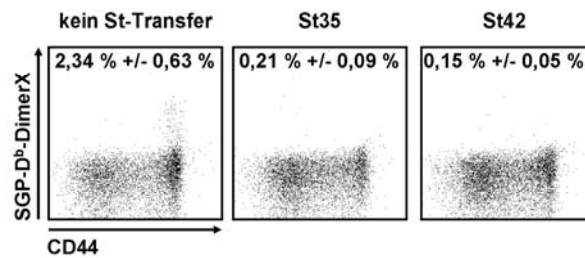


Abbildung 3.24: Adoptiver Transfer von St35- oder St42-T-Zellen inhibieren die endogene SGPSNTPPEI-H2-D^b spezifische CD8-Antwort.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen wurden in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden diese Tiere, sowie Tiere ohne jeglichen adoptiven Transfer mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und zur durchflußzytometrischen Analyse mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC-, α -CD90.1-PE-Cy7- und α -CD44-APC-Antikörpern, sowie einem PE-markierten SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX gefärbt. Es sind die Signale für CD44 und SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX der CD8⁺CD45.1⁻CD90.1⁻PI⁻-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der SGPSNTPPEI-H2-D^b-DimerX⁺CD44⁺ Zellen an der gesamten CD8⁺CD45.1⁻CD90.1⁻-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

3.4.3 St42-CTLs proliferieren *in vivo* auf Kosten der St35-CTLs

Nachdem also gezeigt werden konnte, dass sich das System, entsprechend zuvor beschriebener Modelle prinzipiell zur Analyse der Konkurrenz von T-Zellen *in vivo* eignete, sollte nun überprüft werden, ob sich eine Konkurrenz der beiden transgenen T-Zelllinien untereinander *in vivo* beobachten ließe.

So wurden in einem ersten Ansatz 60.000 St35- und 60.000 St42-T-Zellen in dieselbe B6-Empfängermaus adoptiv transferiert. Diese wurde dann mit 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) und p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milzen zur durchflußzytometrischen Analyse entnommen. Eine Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD8, CD90.1, CD45.1, CD44 und CD62L erlaubte die Analyse des Anteils des jeweiligen T-Zellklons an der Gesamtzahl der in der Milz enthaltenen CD8⁺-T-Zellen, sowie deren Aktivierungszustand. Eine *ex vivo* Peptid-Restimulation mit anschließender durchflußzytometrischer, intrazellulärer Zytokin-Analyse erlaubte eine Aussage über die Funktionalität der T-Zellen.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

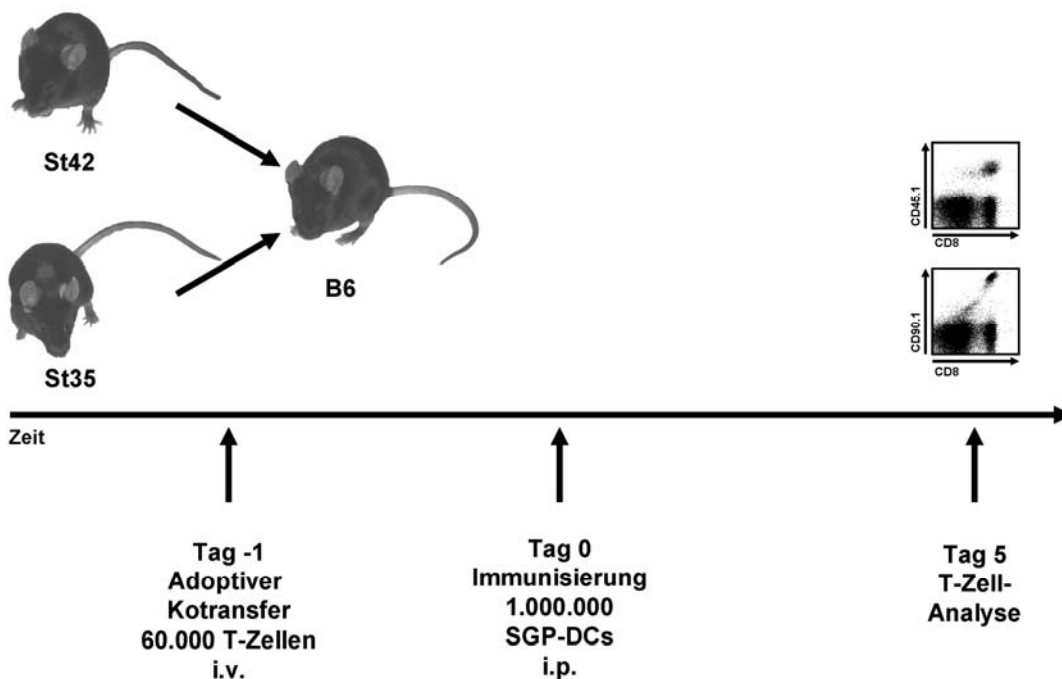


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs beim adoptiven Kotransfer

Wie in Abbildung 3.26 A zu sehen ist, resultierte die Immunisierung von Mäusen nach dem adoptiven Transfer beider T-Zellklone in einer Expansion der St42 T-Zellen (18,7 %), die sich von der Expansion im Einzeltransfer (20,9 %) praktisch nicht unterschied. Betrachtete man dagegen die Expansion der St35-T-Zellen im Kotransfer (4,23 %) gegen den Einzeltransfer (12,5 %), so war deutlich zu erkennen, dass die mitaktivierte St42-T-Zellen die Expansion der St35-T-Zellen stark hemmten. Im Gegensatz zur gemessenen reduzierten Expansion der St35-T-Zellen zeigte sich, dass sich der Phänotyp der Zellen nicht von dem, der im Einzeltransfer expandierten, St35-T-Zellen unterschied (nicht gezeigt). Die entsprechende Beobachtung traf auch auf die St42-T-Zellen zu; die Zellen zeigten im Einzel- und im Kotransfer jeweils einen aktivierten Phänotyp im Bezug auf die CD44- und CD62L-Expression. Die funktionelle Analyse der transgenen T-Zellen ergab ebenfalls in beiden Fällen keine Unterschiede zwischen den T-Zellen aus dem Einzel- und dem Kotransfer. So produzieren 19,3 % der St35 T-Zellen aus dem Einzeltransfer beziehungsweise 22,4 % der St35-T-Zellen aus dem Kotransfer nach Restimulation IFN- γ . Bei den St42-T-Zellen ließen sich entsprechend 24,9 % beziehungsweise 19,8 % messen. Eine Analyse der Lymphknotenzellen erbrachte ein ähnliches Ergebnis (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

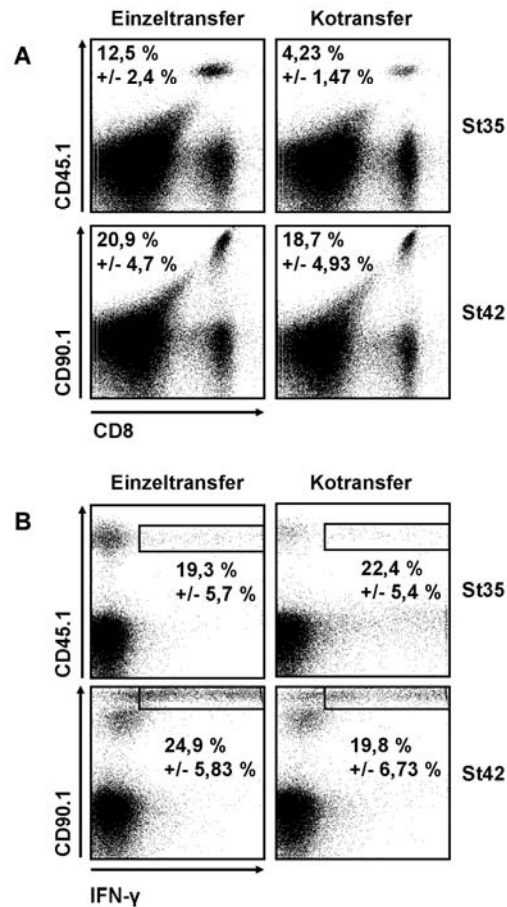


Abbildung 3.26: St42-T-Zellen inhibieren die Expansion von St35-T-Zellen bei Kotransfer.

Es wurden jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen einzeln oder 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI beladenen BMDCs i.p. immunisiert.

A) 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD45.1 beziehungsweise CD90.1 der PI⁻-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

B) 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und für 6 Stunden mit SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α -CD8-PE-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN- γ - und CD45.1- beziehungsweise CD90.1-Signal auf CD8⁺-Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Es stellte sich also heraus, dass die St42-T-Zellen *in vivo* die Expansion der St35-T-Zellen behinderten, dass also Konkurrenz der T-Zellen um die APCs stattfand. In weiteren Experimenten sollte nun überprüft werden, ob sich durch eine Limitierung der APC ein ausgeprägter Effekt der Konkurrenz erkennen ließe.

Hierzu wurden in weiteren Experimenten je 60.000 transgene T-Zellen beider Linien in die gleichen Empfängertiere transferiert und die Tiere mit titrierten Mengen an SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) und p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die T-Zellantworten wie zuvor phänotypisch und funktionell analysiert.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen ist, ergaben sich bei Betrachtung der Expansion der St42-T-Zellen mit Anteilen von 15,5 % (1.000.000 DCs), 17,5 % (300.000 DCs), 15,7 % (100.000 DCs), 11,2 % (30.000 DCs) und 6,13 % (10.000 DCs) an der Gesamtzahl der CD8⁺-T-Zellen ähnlich Werte wie in den Einzeltransfer-Experimenten (vgl. Abbildung 3.20). Bei den St35-T-Zellen dagegen ließen sich Anteile von 3,92 % (1.000.000 DCs), 4,84 % (300.000 DCs), 3,86 % (100.000 DCs), 3,33 % (30.000 DCs) und 1,91 % (10.000 DCs) messen. Diese Werte lagen bei allen DC-Mengen deutlich unter der im Einzeltransfer gemessenen Expansion (vgl. Abbildung 3.20).

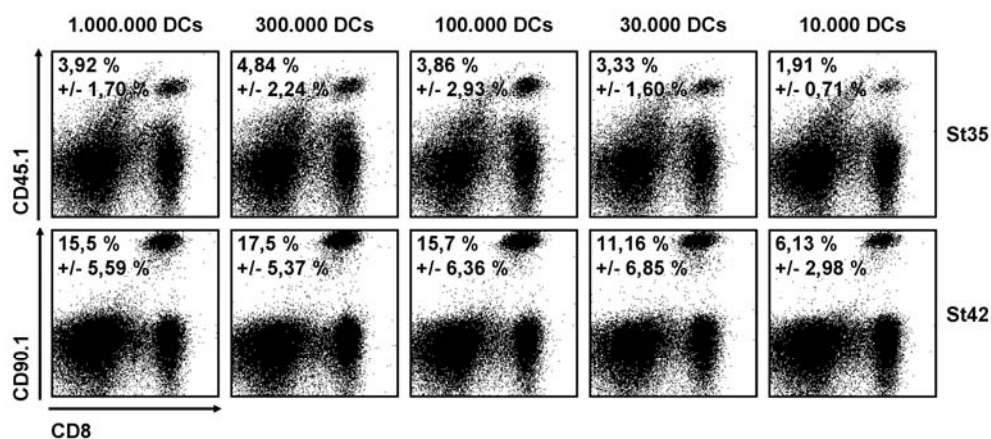


Abbildung 3.27: Die Suppression der St35-T-Zellen im Kotransfer mit St42-T-Zellen ist nicht von der Menge der zur Immunisierung verwendeten DCs abhängig.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen wurden zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD45.1 beziehungsweise CD90.1 der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Berechnete man hier anhand des Anteils der transgenen T-Zellen an der Gesamtzahl der Milzzellen und der absoluten Anzahl der Milzzellen die absolute Anzahl der transgenen T-Zellen, so ergab sich auch hier dieselbe Beobachtung. Es fanden sich mit 1,88 Millionen (1.000.000 DCs), 2,34 Millionen (300.000 DCs), 1,79 Millionen (100.000 DCs), 1,14 Millionen (30.000 DCs) und 0,86 Millionen (10.000 DCs) St42-T-Zellen in den Milzen ähnlich viele Zellen wie in den Einzeltransfer-Experimenten (vgl. Abbildung 3.22). Auch bezüglich dieses Parameters bedeuten hier Werte von 0,46 Millionen (1.000.000 DCs), 0,25 Millionen (300.000 DCs), 0,13 Millionen (100.000 DCs), 0,21 Millionen (30.000 DCs) und 0,21 Millionen St35-T-Zellen in den Milzen deutlich geringere Werte als in den Einzeltransfers (vgl. Abbildung 3.22). Die Analyse des Phänotyps der transgenen T-Zellen ergab im Bezug auf die CD44- und CD62L-Expression erneut keinen Unterschied zwischen den St35- und St42-T-Zellen. Es war in beiden Fällen unabhängig von der Anzahl der zur Immunisierung verwendeten DCs, ein aktivierter Phänotyp zu detektieren (nicht gezeigt).

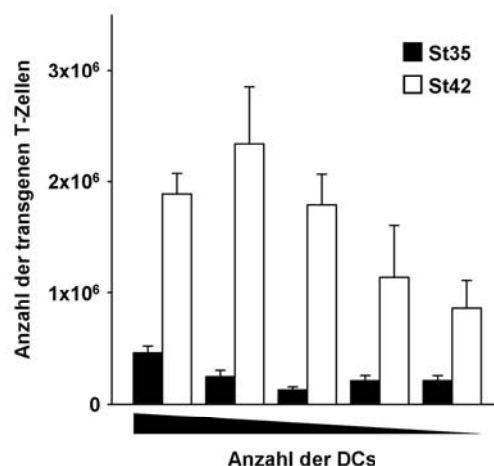


Abbildung 3.28: St35-T-Zellen zeigen bei Konkurrenz gegen St42-T-Zellen gleich bleibende Expansion, unabhängig von der Anzahl der zur Immunisierung verwendeten DCs.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen wurden zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und die Gesamtzellzahl ermittelt. Eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen mit Antikörpern gegen CD8, CD45.1 und CD90.1 erlaubte die Bestimmung des Anteils der transgenen T-Zellen an der Gesamtzellzahl und damit die Berechnung der absoluten Anzahl der in der Milz enthaltenen transgenen T-Zellen. Gezeigt sind die gemittelten transgenen T-Zellzahlen aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe. Die eingezeichneten Fehler geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Das gleiche Ergebnis brachte die Analyse der Funktionalität der T-Zellen im intrazellulären IFN- γ -Test. So ließ sich in den St42-T-Zellen bei Immunisierung mit allen DC-Mengen ein ähnlich hoher Anteil an IFN- γ -produzierenden Zellen messen (Abbildung 3.29). Die Werte lagen entsprechend bei 23,9 %; 30,6 %; 27,6 %; 20,6 % beziehungsweise 19,1 %. Bei den St35-T-Zellen zeigte sich das gleiche Resultat, es wurden Werte von 18,2 %; 21,5 %; 16,4 %; 18,1 % und 7,77 % gemessen.

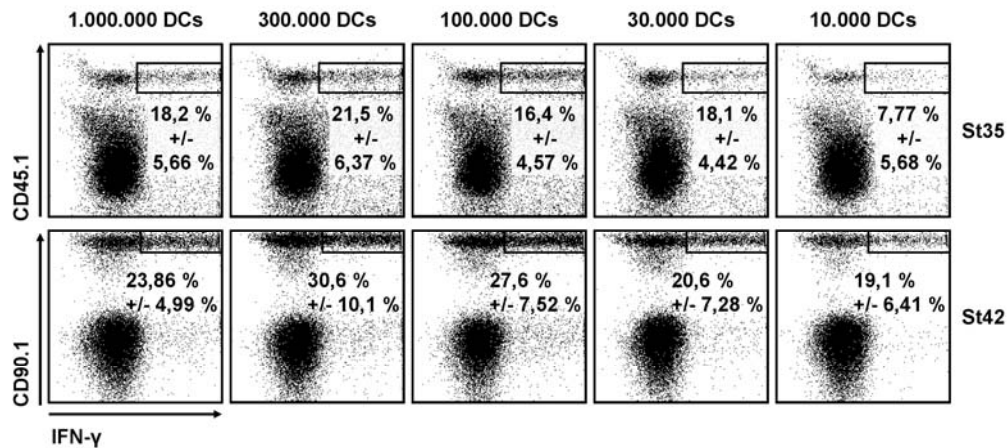


Abbildung 3.29: Die Konkurrenz hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der St35-T-Zellen.

Jeweils 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen wurden zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferriert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000, 300.000, 100.000, 30.000 oder 10.000 p(l:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und für 6 Stunden mit SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α -CD8-PE-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN- γ - und CD45.1- beziehungsweise CD90.1-Signal auf CD8⁺-Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 4 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

Hier zeigte sich also, dass sich das St-Modell zur Analyse der T-Zell-Konkurrenz *in vivo* eignete. So behinderten die St42-T-Zellen im Kotransfer die Expansion der mittransferrierten St35-T-Zellen. Die Größe der Effektorpopulation war im Vergleich zum Einzeltransfer der St35-T-Zellen deutlich reduziert. Die Menge der St35-Effektor-T-Zellen ging jedoch bei sinkender Zahl der zur Immunisierung verwendeten DCs nicht weiter zurück. Unter den kompetitiven Bedingungen erreichte die St35-Effektorpopulation also stets in etwa die gleiche Größe. Im Gegensatz dazu ließen sich bei den St42-T-Zellen keine Auswirkungen der Konkurrenz auf deren Aktivierung messen. Die Analyse des Aktivierungszustandes und der Funktionalität aller erhaltenen Effektorzellen zeigte, dass die Konkurrenz, abgesehen von der

Expansion der St35-T-Zellen, keinen Einfluss auf die induzierte T-Zellantwort zu haben schien.

Wurden die Tiere nach dem Kotransfer beider T-Zellpopulationen mit größeren Mengen an DCs (bis zu 10.000.000) immunisiert, so hatte dies keinen Einfluss auf die T-Zellantwort, die volle Expansion der St35-T-Zellen konnte also selbst durch Immunisierung mit großen Mengen an DCs nicht erreicht werden (nicht gezeigt). In weiteren Experimenten wurde die Menge des auf die DCs geladenen Peptids ausgehend von 100 nM zu höheren und niedrigeren Konzentrationen hin verändert und die Tiere mit je 1.000.000 p(I:C) aktivierten DCs i.p. immunisiert. Auch hier ließ sich kein Einfluss der Peptid-Konzentration auf die Konkurrenz der beiden T-Zellklone erkennen (nicht gezeigt).

Zuletzt wurden in einem Kotransferexperiment die Peptid-beladenen (100 nM) DCs i.p. und i.v. injiziert. Auch diese Veränderung der Versuchsbedingungen hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis, so wurde auch hier die St35-Antwort in zuvor beobachtetem Umfang durch die St42-T-Zellen inhibiert (nicht gezeigt).

3.4.4 In der Konkurrenz unterlegene St35-CTLs sind bis zu 40 Tage nach Immunisierung immer noch in der Peripherie zu finden

Nachdem sich in den oben beschriebenen Experimenten kein Unterschied zwischen den in der Konkurrenz gegen die St42-T-Zellen unterlegenen, und den im Einzeltransfer generierten St35-T-Zellen ergab, sollte die Analyse des zeitlichen Verlaufes der T-Zellantwort nach der Konkurrenz zeigen, inwiefern sich diese Antwort und die Antwort nach Einzeltransfer über den fünften Tag nach der Immunisierung hinaus ähneln.

Dazu wurden jeweils 60.000 St35- und St42-T-Zellen in dieselbe Empfängermaus transferiert und die Tiere mit 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) und p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. Die Antwort wurde anhand einer durchflusszytometrischen Analyse der Blutlymphozyten an verschiedenen Tagen nach der Immunisierung verfolgt und mit der Antwort in einzeltransferierten Tieren verglichen (vgl. Abbildung 3.18).

Verglich man, wie in Abbildung 3.30 dargestellt, die St35- und St42-Antworten nach Ko- und Einzeltransfer, so war deutlich zu erkennen, dass sich bezüglich der St42-Expansion keine Unterschiede zwischen Konkurrenz- und Einzeltransferbedingungen erkennen ließen. Es zeigten sich über den gesamten

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

beobachteten Zeitraum hinweg keine Unterschiede bezüglich der Menge der Zellen. Betrachtete man dagegen die St35-Antwort so war auch hier zu erkennen, dass diese unter Wettbewerbsbedingungen deutlich schwächer ausfiel. Zu erkennen war zudem, dass, abgesehen von der geringeren Expansion, der zeitliche Verlauf dem Verlauf unter Einzeltransferbedingungen entsprach. Nach etwa 10 Tagen fand eine Kontraktion der Population statt, die dabei erreichte Zellzahl blieb dann bis zum 40. Tag nach der Immunisierung annähernd konstant.

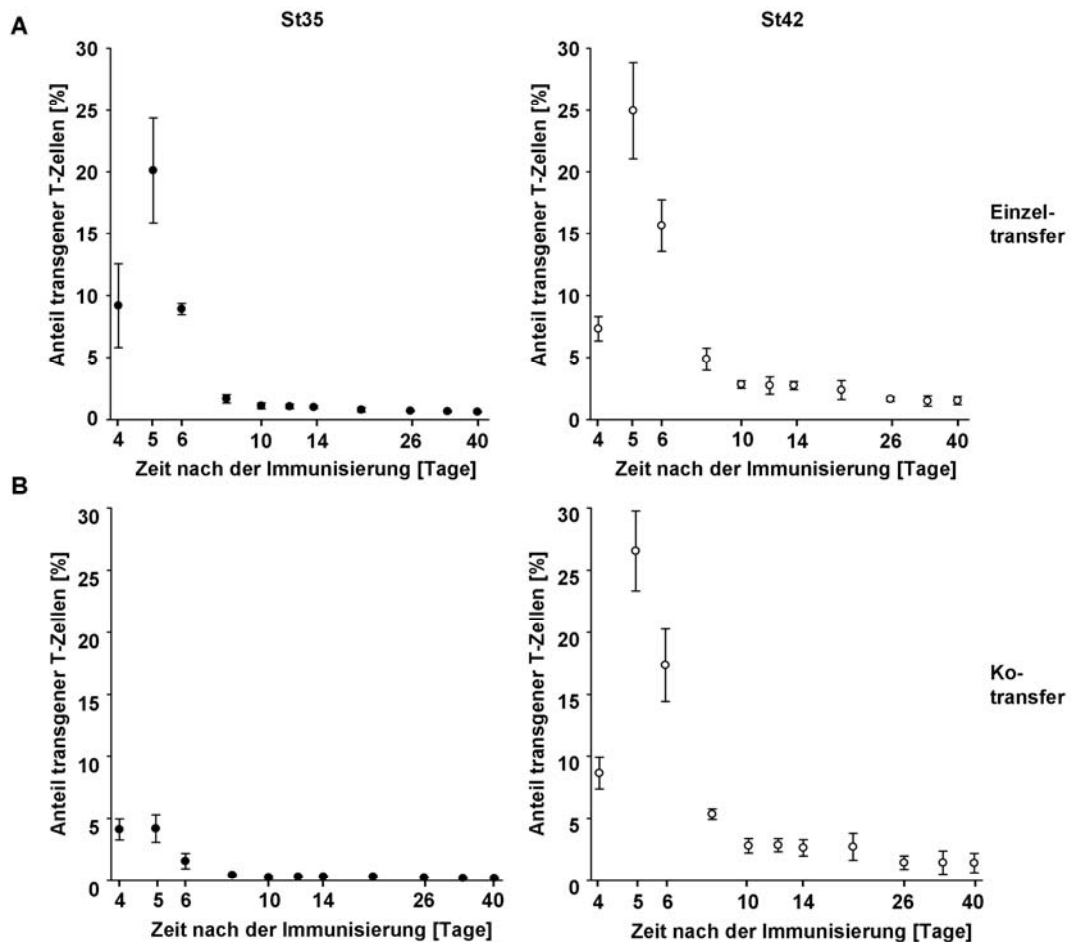


Abbildung 3.30: Die durch Wettbewerb reduzierte St35-Antwort zeigt denselben Zeitverlauf wie die St35-Antwort im Einzeltransfer.

Es wurden jeweils 60.000 CD8⁺-St35- (offene Symbole) beziehungsweise St42- (gefüllte Symbole) Milzzellen einzeln oder 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. An verschiedenen Tagen nach der Immunisierung wurden den Tieren Blutproben zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten entnommen. Die Zellen wurden mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern gefärbt. Die Graphen zeigen für den jeweiligen Tag nach der Immunisierung den Anteil der CD45.1-beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺PI⁻-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten. Gezeigt sind die Werte eines Experiments von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Eine Analyse der Milz, der Lymphknoten und des Knochenmarks der Tiere 40 Tage nach der Immunisierung zeigte, wie in Abbildung 3.31 dargestellt ist, dass sowohl in den ko- als auch in den einzeltransferierten Tieren transgene T-Zellen zu finden waren. Auch hier zeigte sich bei den St42-T-Zellen kein Unterschied zwischen den ko- und einzeltransferierten Tieren. In der Milz wurde ein Anteil von 1,980 % und 1,672 %, in den Lymphknoten von 0,793 % und 0,813 %, sowie im Knochenmark von 1,085 % und 0,864 % gemessen. Bei Betrachtung der St35-Zellen zeigte sich bei den Zellzahlen ein deutlicher Unterschied zwischen Antworten im Einzeltransfer und im Kotransfer. So fanden sich im Einzeltransfer mit 0,889 % transgenen Zellen deutlich mehr als nach Kompetition in der Milz (0,221 %). Entsprechend wurden in den Lymphknoten 0,568 % gegen 0,017 % und im Knochenmark 0,271 % gegen 0,076 % gemessen. Die Analyse der CD44- und CD62L-Expression ergab auch hier bei allen gemessenen transgenen T-Zellen unabhängig von der Zelllinie und den Bedingungen bei der Aktivierung dasselbe Resultat, so waren alle Zellen CD44-hochexprimierend und jeweils etwa 50 bis 60 % CD62L-hochexprimierend (nicht gezeigt).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

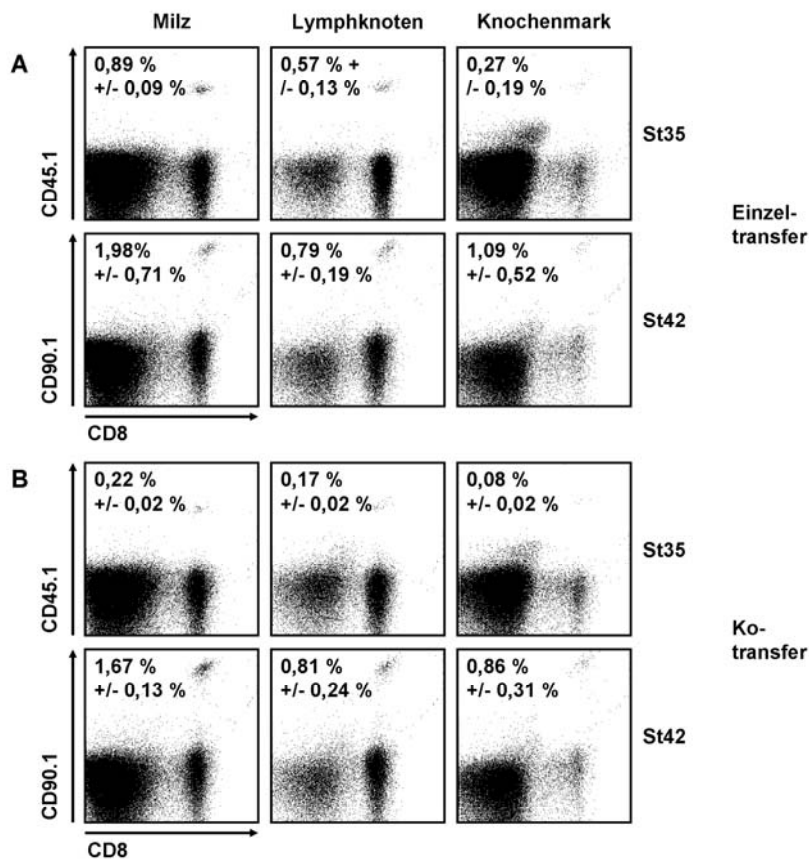


Abbildung 3.31: St35-T-Zellen aus einer durch Competition reduzierten Antwort sind bis zu 40 Tage nach der Immunisierung nachweisbar.

Es wurden jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen einzeln oder 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 40 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen, die Lymphknoten und das Knochenmark aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD45.1 beziehungsweise CD90.1 der jeweiligen PI⁻Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1- beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Dargestellt sind repräsentative Einzelanalysen aus einem von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Um die Fähigkeit der T-Zellen zur Produktion von IFN- γ zu testen, wurden die Milzzellen nach der Entnahme zunächst mit 100 nM SGPSNTPPEI-Peptid über Nacht inkubiert und vor der Färbung zur durchflusszytometrischen intrazellulären IFN- γ -Analyse für weitere 6 Stunden mit 100 nM SGPSNTPPEI-Peptid und 1 μ g/ml Brefeldin A inkubiert. Wie in Abbildung 3.32 zu sehen ist produzierten sowohl St35- als auch St42-T-Zellen nach Peptid-Restimulation IFN- γ . So fanden sich nach entsprechender *ex vivo* Peptid-Restimulation 50,3 % IFN- γ -positive Zellen unter den St35- und 36,4 % IFN- γ -positive Zellen unter den St42-Zellen. In den T-Zellen die unter kompetitiven Bedingungen aktiviert wurden, fanden sich entsprechend 41,2 %

(St35) beziehungsweise 42,1 % (St42) IFN- γ -positive Zellen. Es ließ sich also auch hier kein Unterschied zwischen St35-T-Zellen, die im Kotransfer aktiviert wurden und St35 T-Zellen, die im Einzeltransfer aktiviert wurden, erkennen.

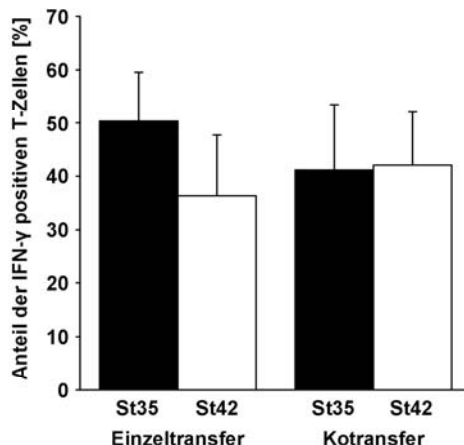


Abbildung 3.32: St35-T-Zellen aus einer durch Konkurrenz reduzierten Antwort sind bis zu 40 Tage nach der Immunisierung funktionell.

Es wurden jeweils 60.000 CD8⁺-St35- beziehungsweise St42-Milzzellen einzeln oder 60.000 CD8⁺-St35- und St42-Milzzellen zusammen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurden die Tiere mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 40 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen der Mäuse entnommen und zunächst für 12 Stunden mit SGPSNTPPEI inkubiert, nach weiteren 6 Stunden mit SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium wurden die Zellen zunächst mit α -CD8-PE-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Gezeigt sind die Werte eines Experiments von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Erneut lässt sich also klar beobachten, dass die in der Konkurrenz um die APCs unterlegenen St35-T-Zellen lediglich eine verringerte Expansion zeigen. Die erhaltenen Effektorzellen sind jedoch vollständig aktiviert und funktionell. Ebenso bildet sich eine zwar in der Größe reduzierte, jedoch funktionelle Gedächtnispopulation aus.

3.4.5 St35-CTLs proliferieren *in vivo* bei Transfer größerer Mengen an St35-Zellen auf Kosten der St42-CTLs

In allen bisher gezeigten Experimenten konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen trotz Anwesenheit der St42-Zellen eine maximale Aktivierung der St35-T-Zellen zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Transfer von 60.000 St42-Zellen ausreichte, um selbst die größte zuführbare Menge an Antigen abzusättigen und so die vollständige Aktivierung der St35-Zellen

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

unter allen bisher beobachteten Bedingungen abzublocken. Aus diesem Grund sollten im Folgenden Experimente durchgeführt werden, bei denen, bei konstanter Anzahl an St35-T-Zellen titrierte Mengen an St42-T-Zellen transferiert wurden.

Dementsprechend wurden also jeweils 200.000 St35-T-Zellen in B6 Mäuse transferiert, daneben erhielten die Mäuse einen Transfer von 200.000, 60.000, 20.000, 6.000 oder keinen St42-T-Zellen. Anderen Mäusen wurden lediglich die entsprechenden Mengen an St42-T-Zellen transferiert. Nach dem Transfer wurden die Mäuse mit 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) und p(I:C)-aktivierten DCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse entnommen, entsprechend präpariert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, resultierte die Reduktion der Menge der St42-Zellen im Kotransfer in der Tat in einer stärkeren Expansion der St35-T-Zellen. So zeigte sich, ab einem St35- zu St42-Adoptiv-Transferverhältnis von 10 zu 1 eine Expansion der St35-T-Zellen die in etwa mit der Expansion im Einzeltransfer zu vergleichen war. Der Anteil der St35-T-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population betrug bei einem Transferverhältnis von 1:1 und 3:1 noch 2,74 % und 2,79 %, stieg dann aber bei einem Verhältnis von 10:1 und 30:1 auf 10,3 % beziehungsweise 13,1 % an, was in etwa dem Wert aus des Einzeltransfer entsprach (16,4 %). Entsprechend umgekehrt verhielt sich die Expansion der St42-T-Zellen, so waren bei den großen Transfermengen 15,3 % beziehungsweise 12,3 % der CD8⁺-T-Zellen St42-Zellen, dieser Wert fiel bei einem Transfer von nur 20.000 beziehungsweise 6.000 St42 T-Zellen auf 5,46 % und 2,52 % ab. Wurden dagegen lediglich die entsprechenden Mengen an St42 T-Zellen transferiert, so ergaben sich mit 21,2 %; 18,3 %; 12,1 % und 12,7 % durchgehend ähnliche Werte, unabhängig von der Ausgangszahl der St42-T-Zellen.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

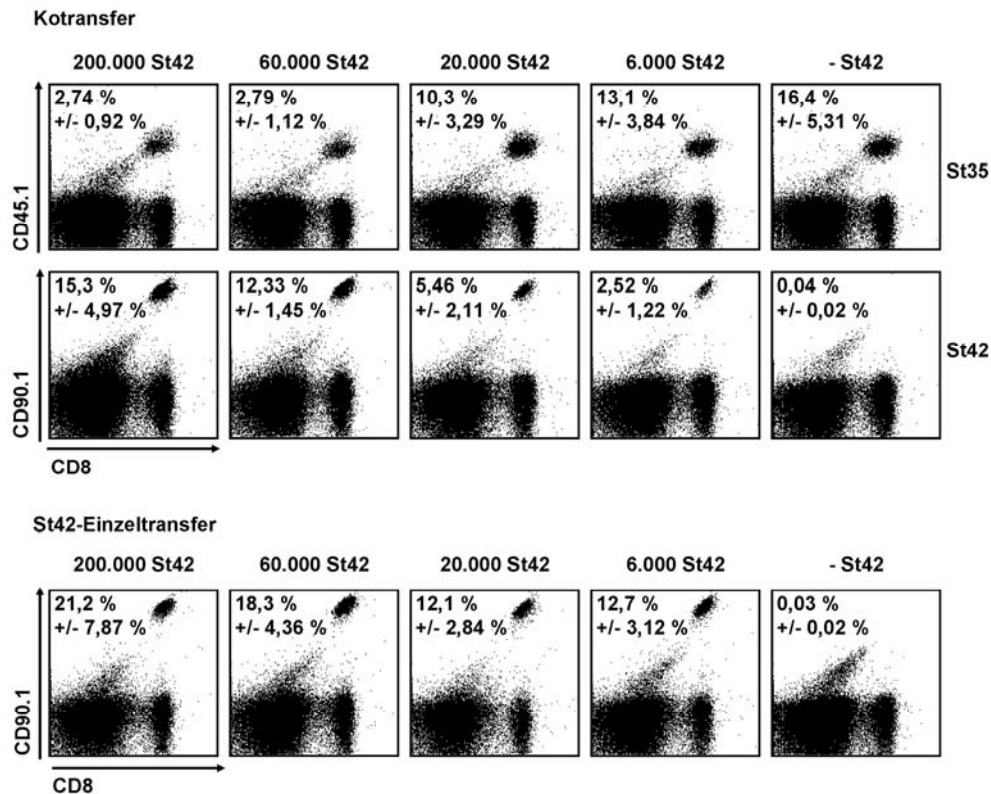


Abbildung 3.33: Hohe St35-Vorläuferzahlen supprimieren die St42-Antwort im Kotransfer.

Jeweils 200.000 CD8⁺-St35- wurden alleine sowie zusammen mit 200.000, 60.000, 20.000 beziehungsweise 6.000 St42-Milzzellen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. Entsprechend wurden 200.000, 60.000, 20.000 oder 6.000 St42-Milzzellen einzeln in B6-Mäuse transferiert. 24 Stunden später wurden diese Tiere, sowie Tiere ohne Transfer mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Die Zahlen geben den Anteil der CD45.1 beziehungsweise CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Berechnete man hier jeweils die in der Milz vorhandene absolute Anzahl der St-Zellen, so ergab sich ein identisches Bild (siehe Abbildung 3.34). So ließen sich im Kotransfer mit den hohen Zahlen an St42-T-Zellen 0,43 Millionen beziehungsweise 0,60 Millionen St35-T-Zellen in den Milzen zählen; dieser Wert näherte sich bei niedrigen St42-Zellzahlen dem Wert von 1,64 Millionen aus dem Einzeltransfer mit 1,38 Millionen und 1,32 Millionen gezählten Zellen an. Entsprechend zählte man bei den St42-T-Zellen bei hohen Transferzahlen 2,12 Millionen beziehungsweise 2,01 Millionen und 1,45 Millionen beziehungsweise 0,36 Millionen bei den niedrigen Transferzahlen. Auch hier war die Anzahl der St42-Zellen im Einzeltransfer mit 2,25 Millionen; 2,40 Millionen; 1,80 Millionen und 1,70 Millionen über alle Titrationsstufen hinweg relativ stabil.

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

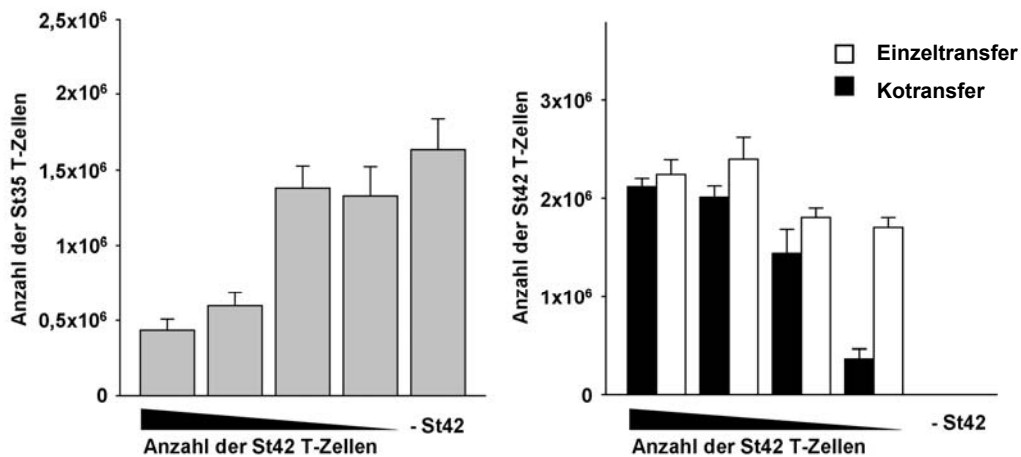


Abbildung 3.34: Hohe St35-Vorläuferzahlen resultieren in verstärkter Expansion der St35-T-Zellen im Kotransfer mit St42-T-Zellen.

Jeweils 200.000 CD8⁺-St35- wurden alleine sowie zusammen mit 200.000, 60.000, 20.000 beziehungsweise 6.000 St42-Milzzellen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. Entsprechend wurden 200.000, 60.000, 20.000 oder 6.000 St42-Milzzellen einzeln in B6-Mäuse transferiert. 24 Stunden später wurden diese Tiere, sowie Tiere ohne Transfer mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und die Gesamtzellzahl ermittelt. Eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen mit Antikörpern gegen CD8, CD45.1 und CD90.1 erlaubte die Bestimmung des Anteils der transgenen T-Zellen an der Gesamtzellzahl und damit die Berechnung der absoluten Anzahl der in der Milz enthaltenen transgenen T-Zellen. Gezeigt sind die gemittelten transgenen T-Zellzahlen aus 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe. Die eingezeichneten Fehler spiegeln den Standardfehler des Mittelwertes wider.

Wie in allen vorhergehenden Experimenten zeigten auch hier alle analysierten T-Zellen denselben aktivierten Phänotyp, unabhängig von den Bedingungen während der Aktivierung (nicht gezeigt). Entsprechend ist in Abbildung 3.35 zu sehen, dass auch die Produktion von IFN- γ nach *ex vivo* Peptid-Restimulation unabhängig von den Bedingungen während der Aktivierung war. So produzierten die St35-T-Zellen unabhängig von der Zahl der transferierten St42-T-Zellen etwa zu einem ähnlichen Prozentsatz IFN- γ (14,3 %; 12,5 %; 10,5 %; 13,7 %; 11,9 %). Dasselbe galt für die St42-T-Zellen aus dem St35-Kotransfer, hier waren ebenfalls mit 21,0 %; 15,2 %; 12,3 % und 15,8 % durchgehend ähnliche Werte zu messen. Diese entsprachen außerdem etwa den Werten aus den Einzeltransfers (10,7 %; 15,9 %; 10,7 %; 13,4 %).

3. Ergebnisse – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

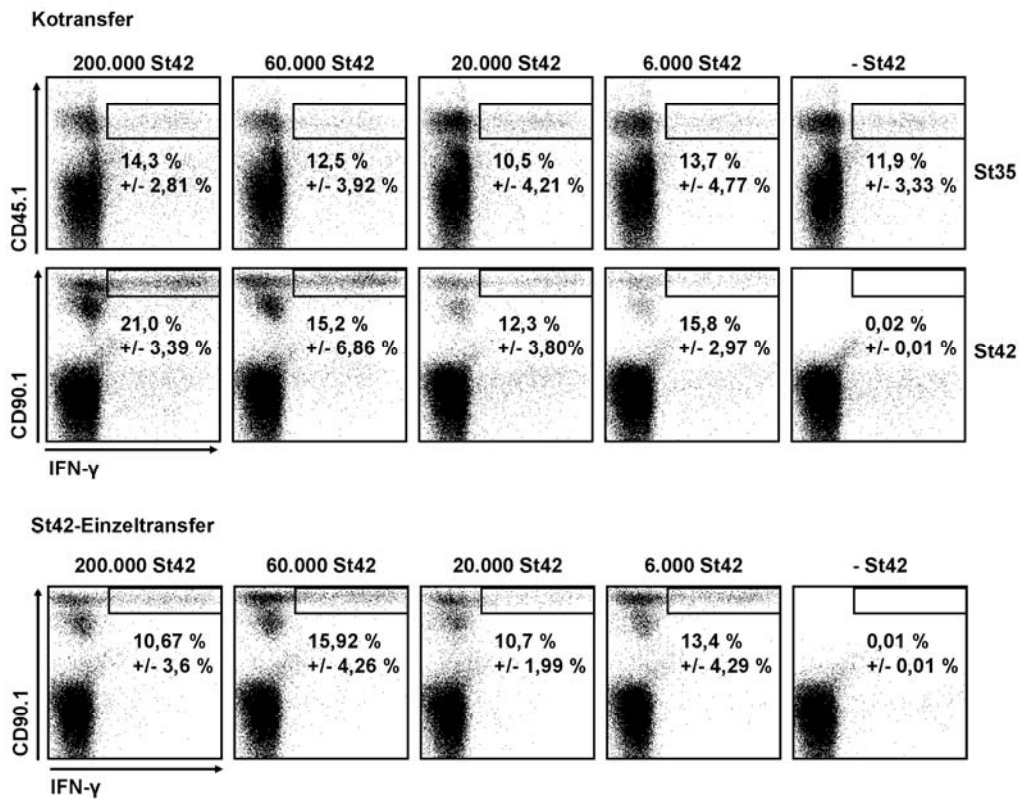


Abbildung 3.35: Die Konkurrenz mit großen Mengen an St35-T-Zellen hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der St42-T-Zellen

Jeweils 200.000 CD8⁺-St35- wurden alleine sowie zusammen mit 200.000, 60.000, 20.000 beziehungsweise 6.000 St42-Milzzellen in B6-Mäuse adoptiv transferiert. Entsprechend wurden 200.000, 60.000, 20.000 oder 6.000 St42-Milzzellen einzeln in B6-Mäuse transferiert. 24 Stunden später wurden diese Tiere, sowie Tiere ohne Transfer mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und für 6 Stunden mit SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α -CD8-PE-, α -CD45.1-FITC- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN- γ - und CD45.1- beziehungsweise CD90.1-Signal auf CD8⁺-Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Zusammenfassend kann hier also beobachtet werden, dass die Vorläuferfrequenz der an der Konkurrenz beteiligten T-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die induzierte Antwort hat. So können auch die ansonsten überlegenen St42-T-Zellen in der Konkurrenz mit einer größeren Anzahl der ansonsten unterlegenen St35-T-Zellen in den Hintergrund gedrängt werden. Wie zuvor stellt sich auch hier heraus, dass die in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen lediglich eine reduzierte Expansion zeigen, jedoch vollständig aktiviert und funktionell sind.

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen spielen bei der Bekämpfung von intrazellulär vorkommenden Pathogenen, sowie bei der Eliminierung entarteter körpereigener Zellen eine entscheidende Rolle. Es ist daher von Interesse, Methoden zu entwickeln, die die gezielte Aktivierung dieses Arms des Immunsystems erlauben. Um dieses Ziel zu erreichen müssen zuvor jedoch die Grundprinzipien der Aktivierung der T-Zellen erforscht und verstanden werden. Hierbei handelt es sich um äußerst komplexe Vorgänge, so dass es nahezu unmöglich ist, einzelne Ereignisse und Größen isoliert zu beobachten. Aus diesem Grund werden *in vivo* Modelle benötigt, in denen einzelne Komponenten des Systems beobachtet werden können, ohne dass andere Größen beeinflusst wurden, beziehungsweise einen nicht abzuschätzenden Einfluss auf das System haben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein solches Modell etabliert werden und zur Aufklärung grundlegender Prinzipien der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen herangezogen werden.

4.1 Die St35- und St42-T-Zellen

Das St-Modell sollte durch Variation der Expressionsstärke des TCR die Analyse des Einflusses der TCR-Dichte auf die verschiedenen Funktionen der CD8⁺-T-Zellen erlauben. Im Gegensatz zu einem zuvor beschriebenen Modell (Labrecque et al., 2001) wurde hier darauf geachtet, dass die TCR-Dichte der verschiedenen T-Zellen über die ganze Lebensdauer der Zellen hinweg stabil bleibt und sich die verschiedenen T-Zellen zudem in *in vitro* als auch in *in vivo* Experimenten miteinander vergleichen lassen.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden insgesamt drei TCR-transgene Mausstämme generiert. Dabei wurde das TCR-Transgen unter dem humanen CD2-Promoter ungerichtet ins Genom integriert und drei Klone (St35, St40, St42) selektioniert, die sich in ihrer TCR-Expression signifikant voneinander unterscheiden. Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Expression des Rezeptors auf den St40-T-Zellen nicht ausreicht, um eine volle Funktionalität der T-Zellen zu gewährleisten (Hofmann et al., 2004) sollten in der vorliegenden Arbeit die Linien mit der hohen (St42) und der mittleren (St35) TCR-Expression im Detail analysiert und

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

verglichen werden. So wurde hier zunächst beobachtet, dass T-Zellen des St35-Stammes etwa 3-mal mehr TCR als die des St40-Stammes (nicht gezeigt), jedoch 2- bis 3-mal weniger als die des St42-Stammes exprimieren.

Die ersten Analysen zeigten, dass sich die St35-T-Zellen nur in äußerst geringem Maße von den St42-T-Zellen unterscheiden. So fällt bei den phänotypischen Analysen der naiven T-Zellen auf, dass sich in beiden Mausstämmen vergleichbare Mengen an naiven T-Zellen finden, während der Vergleich dieser Größe zwischen St40- und St42-Mäusen einen 20- bis 100-fachen Unterschied erkennen lässt. Die Menge der TCR-Expression im St35-Stamm reicht also für eine effiziente Selektion der Thymozyten aus. Es wurde zudem beobachtet, dass sich, neben der absoluten T-Zellzahl in der Peripherie, auch bei der Analyse verschiedener Oberflächenantigene keine Unterschiede zwischen beiden Linien manifestieren. Zusammen mit der Erkenntnis, dass sich bei der Aktivierung der Zellen mit PMA und Ionomycin, beziehungsweise α -CD3- und α -CD28-Antikörpern *in vitro* keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Zellen ergeben, lässt sich annehmen, dass weder Modifikationen auf der Zelloberfläche noch in der Signalkaskade der St35-T-Zellen zur Kompensation der geringeren TCR-Expression stattfinden. Die auf den St35-Thymozyten exprimierte Menge an TCR an sich scheint also für eine, den St42-Thymozyten vergleichbare Reifung auszureichen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass ein bestimmter Schwellenwert an TCR-Signal benötigt wird um eine effektive Selektion der Thymozyten zu erlauben. Um verlässliche Aussagen über den Einfluss des TCR-Signals auf die Reifung der Thymozyten machen zu können, sollten detaillierte Untersuchungen der Thymozyten folgen. Mittels durchflusszytometrischer Analysen ließen sich anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle die verschiedenen Entwicklungsstadien der Thymozyten genauestens verfolgen (Starr et al., 2003). Somit könnten Rückschlüsse auf die erfolgreiche Passage der jeweiligen Kontrollstellen der Thymozyten gezogen werden. Um den Einfluss der Expressionsdichte des TCR auf die Selektion der T-Zellen noch genauer aufzulösen, wären zudem Kreuzungen der Stämme, die in einer Addition des jeweiligen Expressionslevels des Rezeptors resultieren könnten, denkbar.

Betrachtet man die absoluten T-Zellzahlen in der Peripherie der Tiere, so zeigt sich, dass die Kinetik des Anwachsens der Populationsgröße in beiden Stämmen gleich ist. Es schien also bezüglich der homöostatischen Proliferation der Zellen in der Peripherie keine Unterschiede zwischen beiden Klonen zu geben. Um verlässliche

Aussagen treffen zu können bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. So sollten Effekte der homöostatischen Proliferation eindeutig von Effekten veränderter Reifung im Thymus unterschieden werden.

4.2 Aktivierung der St-T-Zellen *in vitro*

Vergleicht man das Verhalten der St35- und St42-T-Zellen bei der Aktivierung *in vitro*, so ergeben sich keine detektierbaren Unterschiede. Unter allen Bedingungen verhalten sich St35- und St42-CTLs praktisch identisch. So ist weder mit reduzierter Menge des SGPSNTPPEI-Peptids noch mit einer Verringerung der Anzahl der zur Aktivierung verwendeten DCs ein Unterscheid in der Aktivierung der beiden T-Zellklone herauszuarbeiten. Die Kinetiken der Proliferation und der Expression der Aktivierungsmarker sind ebenfalls bei beiden Klonen identisch, zudem zeigen die jeweiligen Effektorzellen volle Funktionalität. Weder bezüglich der spezifischen Lyse noch bezüglich der Produktion von IFN- γ lassen sich Unterschiede erkennen. Die St35- und St42-T-Zellen unterscheiden sich *in vitro* also nicht in ihrer funktionellen Avidität.

Zieht man den Vergleich zu den St40-T-Zellen, so lässt sich feststellen, dass bei der Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen *in vitro* das TCR-Signal einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muss, um eine vollständige Aktivierung der Zellen zu gewährleisten. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Auphan-Anezin and Schmitt-Verhulst, 2001; Auphan-Anezin et al., 2003; Faroudi et al., 2003; Valitutti et al., 1995; Valitutti et al., 1996).

4.3 Aktivierung der St-T-Zellen *in vivo*

Geht man nun von der *in vitro* durchgeführten Aktivierung der St-Zellen zum *in vivo* System über, so zeigt sich, dass die vorherigen Beobachtungen nicht vollständig auf die Bedingungen *in vivo* übertragbar sind. So ist zu beobachten, dass sich der TCR-Dichteunterschied zwischen St35- und St42-T-Zellen auf die Aktivierung der T-Zellen deutlich auswirkt. Im Vergleich zur St42-Effektorpopulation ist eine deutlich kleinere St35-Effektorpopulation zu messen. Hieraus lässt sich also zunächst ableiten, dass die *in vitro* Aktivierung der T-Zellen kein adäquates Modell für *in vivo* Situationen ist. Offensichtlich reicht die TCR-Dichte der St35-Zellen entgegen der Erwartung *in vivo* nicht für eine der St42-Antwort entsprechende Expansion aus. Dagegen zeigt sich, dass sich die Zellen in ihren Funktionen und in ihrem Phänotyp praktisch nicht von

den St42-Effektorzellen unterscheiden. Entsprechendes ergibt die Betrachtung der Kinetik der Antwort sowie der Bildung der Gedächtnisantwort. Hier lässt sich feststellen, dass sowohl die St35- als auch die St42-Gedächtnispopulation zu 50 bis 60 % aus T_{CM}-Zellen besteht. Es zeigt sich ferner, dass sich die Antwort der St35- und St42-Zellen, unabhängig von den Immunisierungsbedingungen, in jeweils gleichem Maße unterscheiden. Geringere Anzahlen von DCs, sowie geringere Konzentrationen des Peptids führen nicht zu einer weiteren Reduktion der St35-Antwort.

Die Tatsache, dass es sich bei den St35-Zellen nach der Immunisierung um vollständig ausdifferenzierte Effektorzellen handelt wirft die Frage auf, wie die reduzierte Größe der St35-Effektorpopulation zustande kommt. So könnten die St35-T-Zellen aufgrund der niedrigeren TCR-Dichte ein, zu den St42-T-Zellen unterschiedliches Signal erhalten, was in einer reduzierten Proliferation der Zellen resultiert. Darüber hinaus wäre denkbar, dass die reduzierte TCR-Dichte die Häufigkeit beziehungsweise die Qualität der T-Zell-APC-Kontakte beeinflusst, sodass in vielen Fällen der Kontakt der St35-T-Zellen zu den APCs nicht zur Aktivierung ausreicht. So ist bekannt, dass ein erstes TCR-Signal benötigt wird, um die vollständige Ausbildung der Immunologischen Synapse zu initiieren (Lee et al., 2002). Die niedrigere TCR-Dichte der ST35-T-Zellen könnte also in vergleichsweise wenigen Fällen ausreichen um ein entsprechendes Signal zu generieren. Würde dieses Signal jedoch induziert käme es zur Ausbildung der Synapse und zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle. Die aktivierten Zellen würden also dasselbe Signal erhalten wie die St42-T-Zellen. So würden dann vergleichsweise weniger St35-T-Zellen in einem den St42-Zellen vergleichbaren Maße proliferieren. Es stellt sich also die Frage, ob die niedrigere TCR-Expression der St35-T-Zellen in einem veränderten Signal resultiert, oder ob die geringere Zahl der TCRs die Häufigkeit der Interaktion mit APCs, vielleicht aufgrund seltener ausgebildeter Immunologischer Synapsen, beeinflusst (vergleiche Abbildung 4.1).

Die Beobachtungen, dass alle hier gemachten Analysen voll aktivierte St35-Effektorzellen vermuten lassen und zudem eine funktionelle Gedächtnisantwort ausgebildet wird lassen den Schluss zu, dass vergleichsweise weniger St35-Zellen aktiviert werden und die Größe der Effektorpopulation auf die volle Proliferation weniger Ausgangszellen zurückzuführen ist. Für diese These sprechen auch die Daten aus den *in vitro* Experimenten. Hier konnte gezeigt werden, dass das TCR-

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Signal der St35-CTLs zur vollen Aktivierung der T-Zellen ausreicht. Es wurde jedoch mit hohen Konzentrationen von T-Zellen und APCs gearbeitet, die die Interaktion beider Zelltypen miteinander gewährleisten. Es ist unwahrscheinlich, dass ähnliche Konditionen *in vivo* vorkommen.

Im Gegensatz dazu kann jedoch beobachtet werden, dass die Titration der APCs über weite Strecken zu vergleichbarer Expansion der T-Zellen führt und zudem die Veränderung der Anzahl der vor der Immunisierung transferierten St35-Zellen keinen Einfluss auf die Expansion hat (nicht gezeigt). Die Änderung der statistischen Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von naiver T-Zelle und APC hat also keinen Einfluss auf die Antwort.

Es sollten also weitere, detaillierte Analysen der Effektorpopulationen durchgeführt werden, die einen exakten Vergleich der St35- und St42-Effektorzellen erlauben. So könnte die Analyse weitere Oberflächenmarker, wie zum Beispiel der kostimulatorischen Moleküle CD137 oder OX40 (Serghides et al., 2005; Wilcox et al., 2004) sowie der Rezeptoren für IL-7 und IL-15 (Cayeux et al., 1997; Yajima et al., 2005), eine genauere Phänotypisierung der Effektorzellen erlauben. Zudem sollten Experimente mit vorheriger CFSE-Markierung der T-Zellen erlauben, die Teilungsrate der T-Zellen, beziehungsweise die Menge der nicht aktivierten Zellen zu bestimmen. Die hier beschriebenen Beobachtungen stimmen, zusammen mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit den St40-T-Zellen, mit von anderen Arbeitsgruppen bereits veröffentlichten Daten überein. So konnten Labrecque et al. in einem transgenen Mausmodell, das die Regulation der TCR-Dichte erlaubte zeigen, dass T-Zellen mit dem gleichen TCR aber unterschiedlicher TCR-Expression bis zu einer Dichte von rund 1000 TCR-Molekülen pro Zelle funktionell sind. Dabei ist die Funktion über einen weiten Bereich der TCR-Expression hinweg gewährleistet.

In ihrer Gesamtheit zeigen die hier akquirierten Daten, dass sich das St-Modell gut für die Analyse des Einflusses der TCR-Dichte auf die Funktion von zytotoxischen T-Zellen eignet. Es zeigte sich vor allem, dass der St35- und der St42-Stamm aufgrund der beinahe identischen Funktionalität ein Modell bieten, das auf der einen Seite die Modulation der TCR-Dichte erlaubt und auf der anderen Seite zwei vollständig funktionelle T-Zellklone umfasst. So erlaubt das Modell in einer Vielzahl von verschiedenen Ansätzen die Analyse des Einflusses des TCR-Signals auf die Selektion, die homöostatische Proliferation, die Aktivierung der T-Zellen, die Bildung von Effektor- und Gedächtniszellen, sowie die Funktion aktivierter T-Zellen.

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

An dieser Stelle sei zudem erwähnt, dass eine mutierte Variante des SGPSNTPPEI-Peptids (mSGPSNTPPEI) bekannt ist, welche einen MHC I-Peptid-Komplex mit reduzierter Affinität zum St-TCR bildet (Kast et al., 1989). Im St-Modell ließe sich also sowohl die Anzahl der Bindungen (St40 gegen St35 gegen St42) als auch die Affinität der einzelnen Bindung (SGPSNTPPEI gegen mSGPSNTPPEI) variieren. Somit sind weitere umfangreiche Untersuchungen zum Einfluss der T-Zellavidität auf die verschiedensten Funktionen zytotoxischer T-Zellen, sowie auf das TCR-Signal an sich möglich.

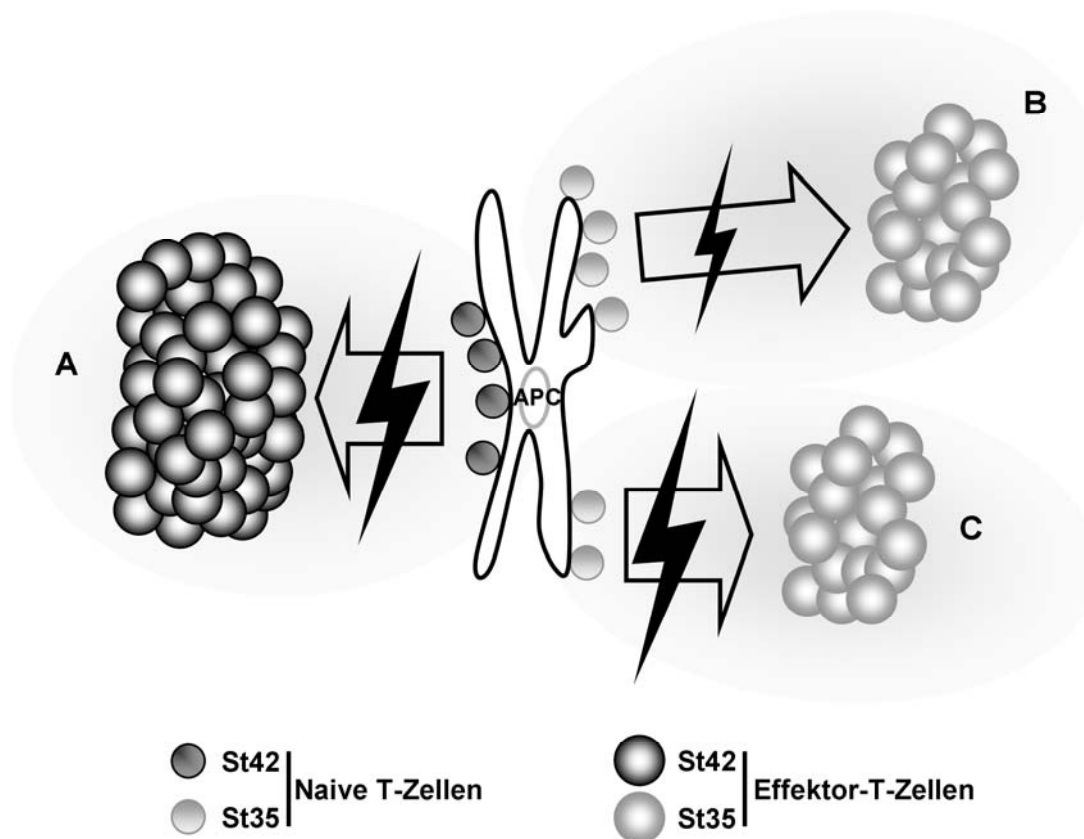


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aktivierung niederavidier CD8⁺-T-Zellen *in vivo*. Schematisch dargestellt ist die Aktivierung hoch- und niederavidier CD8⁺-T-Zellen *in vivo*. Die Aktivierung hochavidier Zellen (A) resultiert in der Bildung einer großen Effektorpopulation. Betrachtet man dagegen die Aktivierung der niederavidier T-Zellen (B, C), so kommt eine deutlich kleinere, jedoch voll funktionelle Effektorpopulation zustande. Hier ist nicht klar, ob vergleichbare Mengen an niederavidier T-Zellen durch ein qualitativ unterschiedliches Signal aktiviert werden und in geringerem Maße proliferieren (B), oder ob eine geringere Anzahl an Zellen ein identisches Signal erhält, was zu einer vergleichbaren Proliferation führt (C).

4.4 Konkurrenz naiver zytotoxischer T-Zellen um APCs

Aufgrund der genannten Faktoren eignet sich das St35/42-Modell zur Untersuchung der Konkurrenz von CTL-Klonen untereinander. Die Konkurrenz beziehungsweise deren Umgehung spielen eine wichtige Rolle bei der gezielten Induktion von CTL-Antworten. Hier ist sie, vor allem in Ansätzen mit mehreren Antigenen, sowie bei klassischen Impfmethoden, bei denen alle zur Immundominanz führenden Effekte voll zur Geltung kommen können, interessant. Die Immunisierung mit mehreren, auch subdominanten, Epitopen bietet den Vorteil, dass sie gegen ein breites Spektrum an Subtypen eines Erregers schützt. Zudem kommt es zum Beispiel bei Influenza Viren durch Mutationen allmählich zur Veränderung des Erregers und somit zur Veränderung des Antigenspektrums. So fehlen nach einer gewissen Zeit alle Epitope, gegen die während einer vorausgehenden Infektion oder Impfung dominante Antworten generiert wurden und es kommt zu einer erneuten Infektion. Eventuell vorhandene subdominante Antigene aus Regionen, die eine geringe Mutationsrate aufweisen, wären entsprechend interessante Kandidaten für die Induktion eines längerfristigen Impfschutzes. Ein weiterer Vorteil von Immunisierungen mit mehreren Antigenen ist vor allem in der Tumormunologie gegeben. Hier wird die Wahrscheinlichkeit des Auswachsens von Tumorzellen, die durch Mutationen einzelne Antigene verlieren und so der Immunantwort entkommen, reduziert.

In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen um Antigen konkurrieren. So unterdrücken adoptiv-transferierte transgene T-Zellen die endogene Antigen-spezifische Antwort, die T-Zellen konkurrieren also um die APCs (Kedl et al., 2000; Kedl et al., 2002; Probst et al., 2003). Bei diesen Modellen wurden jedoch unphysiologisch hohe Mengen an transgenen T-Zellen transferiert. Neuere Veröffentlichungen zeigten jedoch, dass die Menge der adoptiv transferierten T-Zellen einen starken Einfluss auf das Ergebnis des jeweiligen Experiments haben kann (Marzo et al., 2005). Darüber hinaus ließen die Modelle zur T-Zell-Konkurrenz keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen zu.

Hier bietet nun das St35/42-Modell die Möglichkeit, die Konkurrenz zweier T-Zellklone gleicher Rezeptoraffinität für das gleiche Antigen (Effekte durch unterschiedliche Antigenpräsentation werden somit ausgeschlossen) zu untersuchen. Der Transfer gleicher Mengen transgener T-Zellen schließt zudem Effekte aufgrund

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

unterschiedlicher Vorläuferfrequenzen aus, beziehungsweise normalisiert diese Effekte.

Wie hier gezeigt werden konnte, lässt sich mit dem St35/42-Modell Konkurrenz zwischen naiven T-Zellen um Antigen *in vivo* beobachten. So kann beobachtet werden, dass der Transfer von 60.000 St35- oder St42-T-Zellen vor der DC-Immunisierung zur einer vollständigen Unterdrückung der endogenen T-Zellantwort führt, dieses Ergebnis stimmt mit zuvor beschriebenen Erkenntnissen überein (Kedl et al., 2000; Probst et al., 2003). Im direkten Vergleich der hoch- und niederaviden St-T-Zellen zeigt sich, dass die Gegenwart der St42-Zellen in einer deutlich reduzierten St35-Antwort resultiert, während die St42-Antwort nicht von kotransferierten St35-T-Zellen beeinflusst wird.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Konkurrenz lediglich in einer reduzierten Expansion der unterlegenen T-Zellen resultiert, deren Funktion jedoch nicht messbar beeinflusst wird. So zeigen alle resultierenden Effektorzellen einen vollständig aktivierten Phänotyp und sind funktionell. Darüber hinaus ist auch die gebildete Gedächtnisantwort lediglich in Umfang, jedoch nicht in Phänotyp oder Funktionalität reduziert. Es lässt sich feststellen, dass die Konkurrenz nicht in einer Veränderung der Zusammensetzung der Gedächtnispopulation resultiert, so stellen in allen Fällen T_{CM} - und T_{EM} -Zellen jeweils in etwa die Hälfte der Gedächtnispopulation. Es zeigte sich ferner, dass Limitierungen der Bedingungen keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Weder die Immunisierung mit einer reduzierten Anzahl der DCs, noch des auf diesen gebundenen Peptids, haben eine weitere Verminderung der St35-Antwort zur Folge. Umgekehrt zeigt auch eine Erhöhung der Menge des vorhandenen Antigens keinen Einfluss auf die Expansion der St35-T-Zellen.

In einem weiteren Ansatz konnte hier gezeigt werden, dass eine Veränderung des Verhältnisses der Vorläuferfrequenzen hin zu größeren Anteilen der St35-Zellen, zu einer stärkeren Expansion der St35-Zellen und zu einer reduzierten Expansion der St42-Zellen führt. Auch in diesem Fall kann beobachtet werden, dass die in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen einen vollständig aktivierten Phänotyp aufweisen und voll funktionell sind.

Die hier beobachtete Konkurrenz der T-Zellen untereinander resultiert also lediglich in einer verminderten Proliferation der Zellen, ihre Funktion war jedoch in keiner messbaren Weise beeinflusst. Die gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass die

aus der Konkurrenz hervorgehende Antwort des jeweiligen Klons eine Funktion aus der Avidität sowie der Vorläuferfrequenz ist. Die höhere Avidität scheint also die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung der T-Zellen zu erhöhen. Entsprechend kann die Aktivierungswahrscheinlichkeit von T-Zellen niedrigerer Avidität durch Erhöhung ihrer Vorläuferfrequenz verbessert werden (vergleiche Abbildung 4.2).

Wie bereits zuvor, stellt sich auch hier die Frage nach dem Signal, das in den in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen induziert wird. Erneut lässt sich nicht feststellen, ob die unterlegenen T-Zellen ein qualitativ anderes Signal bekommen, oder ob die Konkurrenz in einer Verminderung der Anzahl der effektiven Interaktionen zwischen naiven T-Zellen und APCs resultiert. Die Tatsache, dass die in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellen voll funktionell sind und es ebenfalls zur Ausbildung einer Gedächtnisantwort kommt, spricht eher für ein Szenario bei dem die Zahl der Kontakte verringert wird, etablierte T-Zell-APC-Kontakte aber zu einer vollständigen Aktivierung der Zellen führen. Um genaue Aussagen diesbezüglich treffen zu können, müssten weitere Analysen folgen. So wären auch hier umfangreichere Analysen des Phänotyps der Effektorzellen sowie exakte Untersuchungen zum Proliferationsverhalten notwendig. Experimente mit CFSE-markierten Zellen könnten Aufschluss über die Proliferationsraten, sowie den Anteil der aktivierten Zellen geben. Unter Verwendung dieser Methoden in einem Modell zur Konkurrenz zwischen transgenen T-Zellen unterschiedlicher Spezifität konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Konkurrenz in einer verringerten Anzahl an aktivierten T-Zellen resultierte, diese jedoch in vollem Umfang proliferieren (Willis et al., 2006).

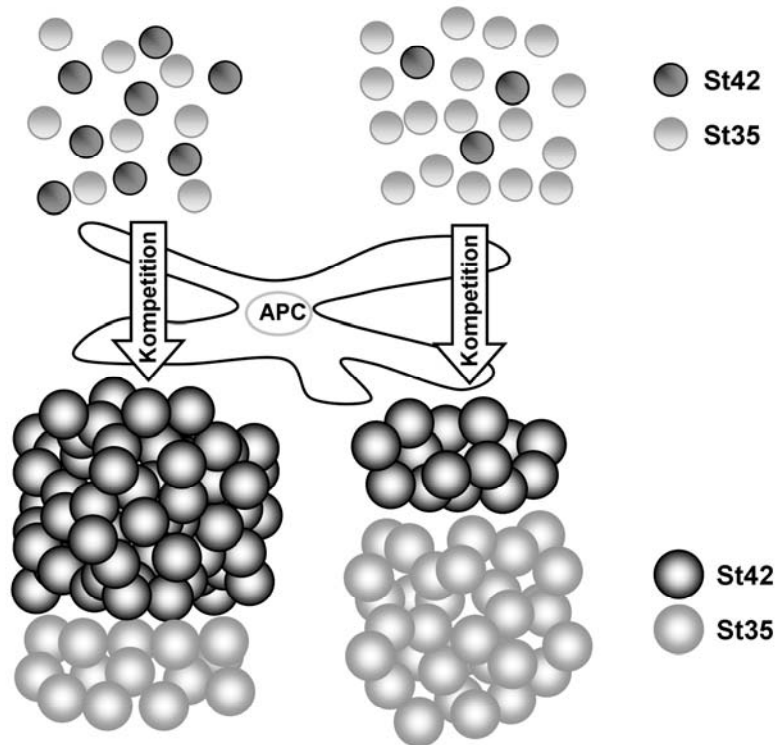


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Einflusses der Avidität und der Vorläuferfrequenz auf die Konkurrenz naiver T-Zellen um Antigen.

Die hier gemachten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Zusammensetzung der Effektorpopulation ein direkt aus der Zusammensetzung des Pools an naiven T-Zellen resultiert. Liegen hochavide und niederavide T-Zellen in etwa gleicher Vorläuferfrequenz vor, so wird die Effektorpopulation von hochaviden Zellen dominiert. Liegen dagegen im naiven T-Zellpool die niederaviden T-Zellen im hohen Überschuss vor, so besteht die Effektorpopulation zum Großteil aus niederaviden Effektorzellen.

Darüber hinaus bleibt die Frage offen, welches der limitierende Faktor bei der Konkurrenz der T-Zellen untereinander ist. Berichte anderer Arbeitsgruppen (Kedl et al., 2000; Kedl et al., 2002) lassen den Schluss zu, dass die APCs der die Konkurrenz bestimmende Faktor sind. Diese Beobachtung kann hier allerdings nicht gemacht werden. Es lässt sich in dem hier angewendeten Modell jedoch auch nicht bestimmen, wie viele der zur Immunisierung verwendeten DCs tatsächlich in den Lymphknoten ankommen. Es lässt sich daher auch nicht testen, ob eine Erhöhung der Anzahl der injizierten Zellen auch eine Erhöhung der Anzahl der DCs im Lymphknoten zur Folge hat.

Nimmt man an, dass die APCs tatsächlich der limitierende Faktor in der Konkurrenz sind, gilt zu beachten, dass Analysen der T-Zell-APC-Interaktion im Lymphknoten Schätzungen erlaubten, wonach bis zu 5000 T-Zellen pro Stunde mit derselben DC

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

interagieren können (Bousso and Robey, 2003; Miller et al., 2004). In diesen Versuchen wurde jedoch die Funktionalität der T-Zellen nicht getestet. Es lässt sich also nicht sagen, ob diese Interaktionen der T-Zellen mit den DCs tatsächlich in einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen resultierten.

Nimmt man nun an, dass T-Zellen in großer Zahl mit einer APC interagieren können, scheint der bloße Kontakt zur APC nicht limitiert, in vielen Fällen zur Aktivierung der Zellen aber nicht ausreichend zu sein. Es kommen also membrangebundene sowie lösliche Faktoren der APC als limitierende Größe in Frage. Kedl et al. konnten beispielsweise zeigen, dass hochaffine T-Zellen die Menge des von ihnen erkannten MHC·Peptid-Komplexes spezifisch auf der Oberfläche der APCs reduzieren können (Kedl et al., 2002). Ob diese Beobachtungen jedoch tatsächlich relevant sind, ist fraglich, da sie mit adoptivem Transfer großer Mengen transgener T-Zellen gemacht wurden. Außerdem lässt sich nicht sagen, wie viele MHC·Peptid-Komplexe der Zelle verbleiben und wie viele davon für die Aktivierung weiterer T-Zellen nötig sind. Neben der Menge an Antigen kämen jedoch auch kostimulatorische Moleküle sowie von den APCs sezernierte Zytokine in Frage. Die Annahme, dass nicht nur das Antigen limitierend ist wurde durch die Beobachtung untermauert, dass auch T-Zellen unterschiedlicher Spezifität um APCs konkurrieren können (Kedl et al., 2002; Willis et al., 2006).

Die in den Kotransfer-Experimenten gemachten Beobachtungen implizieren, dass es bei den Experimenten mit den einzeltransferierten St-Zellen bereits zu interklonaler Konkurrenz kommen kann, sodass auch die dort erhalten Effektorzellen unter kompetitiven Bedingungen entstanden wären. Experimente mit Transfers von bis zu 6.000 St42-Zellen zeigen, dass die Größe der Effektorpopulation unabhängig von der transferierten Menge der Zellen ist (Abbildung 3.34). Es lässt sich also bereits bei 6.000 transferierten T-Zellen Konkurrenz der naiven transgenen T-Zellen untereinander vermuten. Diese Zahl liegt etwas über der vermuteten Anzahl an endogenen, für ein Antigen spezifische T-Zellklone, so wird davon ausgegangen, dass der T-Zellpool mehrere hundert T-Zellen erhält, die für ein Antigen spezifisch sind. Diese Populationen bestehen jedoch aus mehreren Klonen und umfassen somit unterschiedliche Aviditäten (Blattman et al., 2002).

So ließe sich die kleinere St-35 Expansion dadurch erklären, dass die Konkurrenz der Zellen untereinander die Kontaktzeiten der T-Zellen zu den APCs verkürzt, so dass weniger T-Zellen effektiv mit der APC interagieren können und es so zur

4. Diskussion – Einfluss der T-Zellavidität auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen

Proliferation weniger Zellen und somit zu einer kleineren Effektorpopulation kommt. Experimente mit sehr geringen Mengen an transferierten T-Zellen könnten also Bedingungen schaffen, unter denen keine Konkurrenz zwischen T-Zellen auftritt. Die Gegenwart der endogenen T-Zellen würde hier jedoch das Ergebnis beeinflussen, so dass solche Experimente in RAG2^{-/-}-Mäusen oder in zuvor CD8-depletieren Mäusen durchzuführen wären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch im St35/42-Modell Konkurrenz naiver T-Zellen um APCs *in vivo* nachweisen lässt. Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen aus anderen Arbeiten (Kedl et al., 2000; Kedl et al., 2002; Probst et al., 2003; Willis et al., 2006). Während diese jedoch auf dem Vergleich relativ großer Mengen adoptiv-transferierter, hochaffiner transgener T-Zellen mit relativ niederraffinen, in niedriger Vorläuferzahl vorkommenden endogenen T-Zellen beruhen, konnte hier erstmals der Einfluss der Vorläuferfrequenz auf die Konkurrenz naiver T-Zellen evaluiert werden. Zudem erlauben die hier gezeigten Daten erstmals Rückschlüsse auf den Phänotyp und die Funktionalität der in der Konkurrenz unterlegenen T-Zellklone. Darüber hinaus implizieren die hier gezeigten Daten, dass eine vorhandene, niederrafide Gedächtniszellpopulation die Aktivierung hochaffiner und somit effektiverer Klone (Alexander-Miller, 2005) inhibieren könnte. Hier würde das St35/42-Modell die Möglichkeit bieten, die Konkurrenz zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen um APCs genauer zu untersuchen. Das Modell würde entsprechend Rückschlüsse auf die Frage erlauben, ob Gedächtnis-T-Zellen in der Konkurrenz um Antigen bei Neuinfektionen aufgrund der höheren Vorläuferfrequenz und der höheren Affinität überlegen sind oder ob andere Faktoren dabei ebenfalls eine Rolle spielen. Zudem eröffnet das Modell die Möglichkeit die Konkurrenz von T-Zellen um MHC I-Peptid-Komplexe bei der homöostatischen Proliferation zu ergründen, auch hier wären Experimente mit naiven und Gedächtniszellen denkbar.

5 Ergebnisse - Transkutane Immunisierung

5.1 Aktivierung transgener CD8⁺-T-Zellen durch transkutane Immunisierung

Wie von Suzuki et al. gezeigt wurde, induziert der Wirkstoff Imiquimod in der kommerziell erhältlichen Aldara-Creme die Aktivierung und Auswanderung von Langerhans Zellen der Epidermis (Suzuki et al., 2000). Diese Beobachtung führte zur Idee, derart aktivierte Zellen mit einem MHC I-Peptid zu beladen und zur Aktivierung von CTLs gegen dieses Peptid zu verwenden. Da es sich bei CTL-Epitopen um relativ kleine Moleküle handelt (Peptide mit einer Länge von etwa 8 bis 10 Aminosäuren entsprechen 1000 g/mol), erschien die nahe liegendste Möglichkeit, das Peptid auf die Zellen zu laden, diese einfach in die Aldara-Creme zu mischen und direkt auf die Haut aufzutragen. Das Peptid sollte dann in die Epidermis beziehungsweise Dermis diffundieren und dort endogene Peptide aus den MHC I Molekülen auf der Oberfläche der Langerhans Zellen beziehungsweise dermalen DCs verdrängen. Der Wirkstoff würde die mit diesem Peptid beladenen Zellen aktivieren und deren Auswanderung in die drainierenden Lymphknoten induzieren. In den Lymphknoten würde dann die Aktivierung spezifischer CTLs erfolgen.

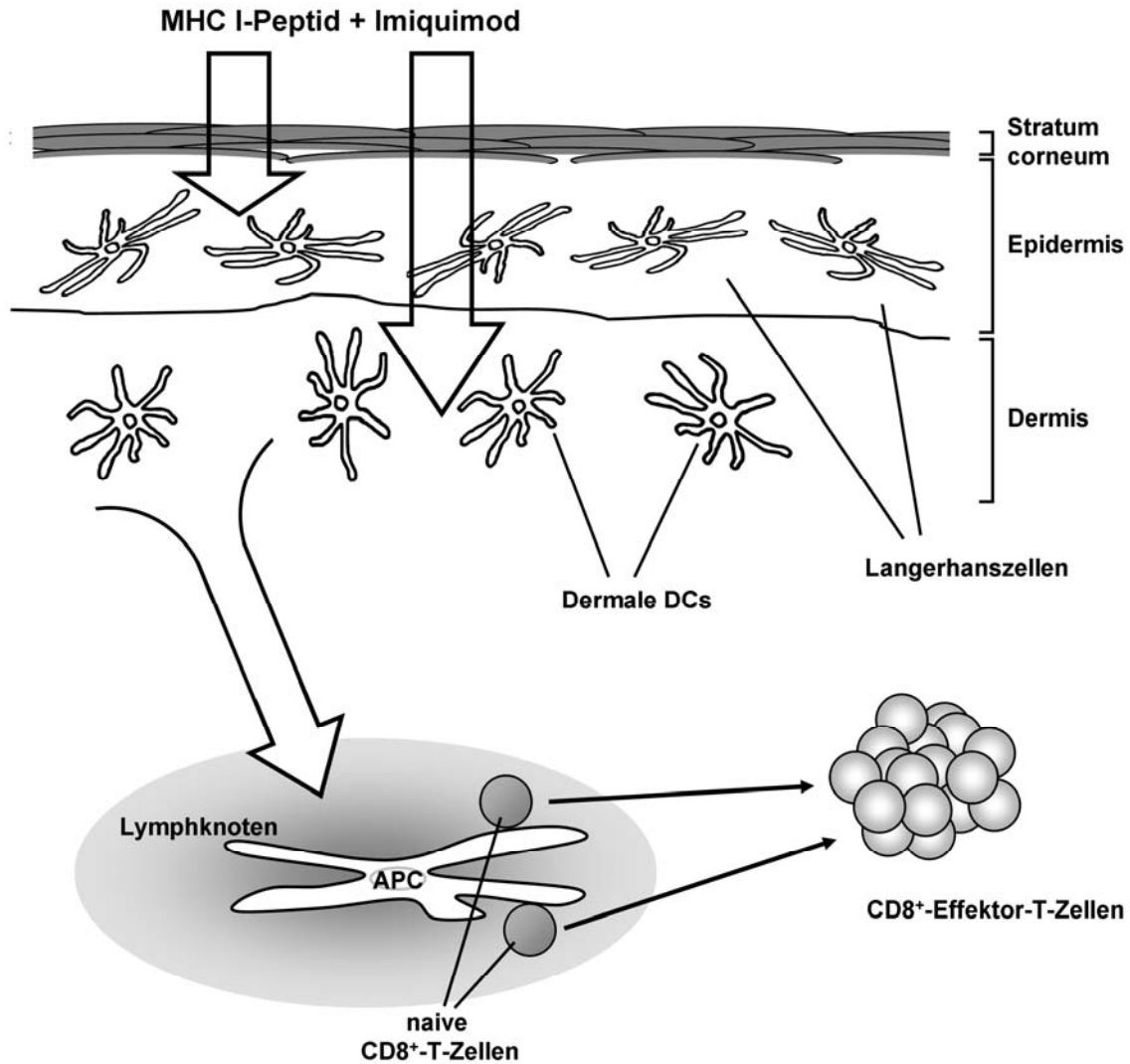


Abbildung 3.1: Grundprinzip der transkutanen Immunisierung mit Imiquimod und einem MHC I-Peptid.

Die Immunisierung beruht auf der Anwendung einer Creme, die neben dem TLR7-Liganden Imiquimod einen MHC I-Liganden enthält. Beide Moleküle durchdringen nach dem Auftragen auf die Haut das Stratum Corneum und diffundieren in die Epidermis, beziehungsweise die Dermis. Dort bindet der MHC I-Ligand an MHC I-Moleküle auf Langerhanszellen, beziehungsweise dermalen DCs. Diese Zellen werden zeitgleich durch den Wirkstoff Imiquimod aktiviert und wandern in die Lymphknoten aus. Dabei treffen die aktivierten DCs auf naive T-Zellen und vermitteln die Aktivierung von T-Zellen die das aufgetragene Peptid spezifisch erkennen, es werden schließlich Antigen-spezifische CD8⁺-Effektor-T-Zellen erhalten. Ob der Effekt über Langerhanszellen oder dermale DCs vermittelt wird ist dabei nicht bekannt. Es ist ebenso fraglich, ob der Wirkstoff Imiquimod direkt auf die Langerhanszellen und die dermalen DCs wirken kann, oder ob der Effekt über andere Zellen vermittelt wird.

Um die Idee dieser transkutanen Immunisierung zu verifizieren, wurde das bereits beschriebene St42-Adoptiv-Transfer-System gewählt. Die transgenen T-Zellen sind leichter als die endogenen T-Zellen zu aktivieren, da sie über einen hochaffinen T-Zellrezeptor verfügen und aufgrund des Transfers in sehr hohen Vorläuferfrequenzen zur Verfügung stehen. Außerdem konnte die induzierte Antwort aufgrund der CD90.1-Systems *in vivo* sehr leicht verfolgt werden. Entsprechend wurde für dieses System das SGPSNTPPEI-Peptid zur Immunisierung verwendet.

Nachdem die Ohren als einzige unbehaarte Stellen eine sehr kleine Fläche zur Immunisierung bieten sollte der Rücken der Mäuse zur Applikation der Impf-Creme auf einer Fläche von etwa 10 cm² enthaart werden. Hierfür wurden den Mäusen unter Betäubung zunächst die Haare mit einem handelsüblichen Langhaarschneider entfernt und die Fläche anschließend mit einem elektrischen Rasierer vollständig glatt rasiert. Um auszuschließen, dass die Rasur Hautirritationen verursachte, die die Immunisierung beeinflussen könnten, wurde die Rasur 2 Tage vor der Immunisierung durchgeführt.

Aufgrund der in der Packungsbeilage der Aldara-Creme empfohlenen Anwendungsfläche wurde ein Sachet der Creme zur Immunisierung von 5 Mäusen verwendet. Pro Maus wurden also 50 mg Aldara appliziert. Um eine möglichst hohe Menge an Peptid in die Creme einarbeiten zu können, ohne jedoch die Konsistenz der Creme dabei zu sehr zu verändern, wurde eine 10 mg/ml in DMSO Lösung des Peptids verwendet. Die Impf-Creme wurde jeweils vorbereitet, indem die Aldara-Creme auf einem Streifen Nescofilm verteilt wurde. Zu einem Aliquot der Creme wurde dann die entsprechende Menge Peptid in DMSO gegeben und die Komponenten mit einer Pipettenspitze solange vermischt, bis sich eine homogene Masse ergab. Diese wurde dann den narkotisierten Mäusen auf den rasierten Rücken gecremt und leicht einmassiert.

5.1.1 Die transkutane Immunisierung mit SGPSNTPPEI-Peptid führt zur systemischen Aktivierung von adoptiv transferierten St42-CTLs

In einem ersten Versuch wurden jeweils etwa 200.000 transgene St42-T-Zellen in tags zuvor rasierte kongene B6-Mäuse adoptiv transferiert. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte 24 Stunden später. Zur Immunisierung wurden die Mäuse erneut betäubt und die Impf-Creme auf den Rücken aufgetragen. Hierbei wurden zwei verschiedene Konzentrationen, 20 und 100 µg des SGPSNTPPEI-Peptids verwendet.

Da nicht bekannt war, ob das Peptid beim einfachen Auftragen auf die Haut in die Epidermis oder Dermis diffundieren konnte, wurde den Mäusen einer Kontrollgruppe Peptid (100 µg in 150 µl PBS verdünnt aus 10 mg/ml in DMSO) intradermal injiziert und die Aldara-Creme auf die darüber liegende Hautpartie aufgetragen. Somit konnte getestet werden, ob die Aldara-Creme als Adjuvans verwendet werden kann, auch wenn das Peptid nicht in die Haut diffundieren konnte. Außerdem wurden Kontrollgruppen integriert, bei denen lediglich Peptid intradermal injiziert wurde. Als Positiv-Kontrolle diente eine i.p. Injektion von 1.000.000 SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) und p(I:C)-aktivierten BMDCs. 4 Tage nach der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die CTL-Antwort analysiert. Hierzu wurde die Milz entnommen und die Zellen nach einer hypotonen Erythrozytenlyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

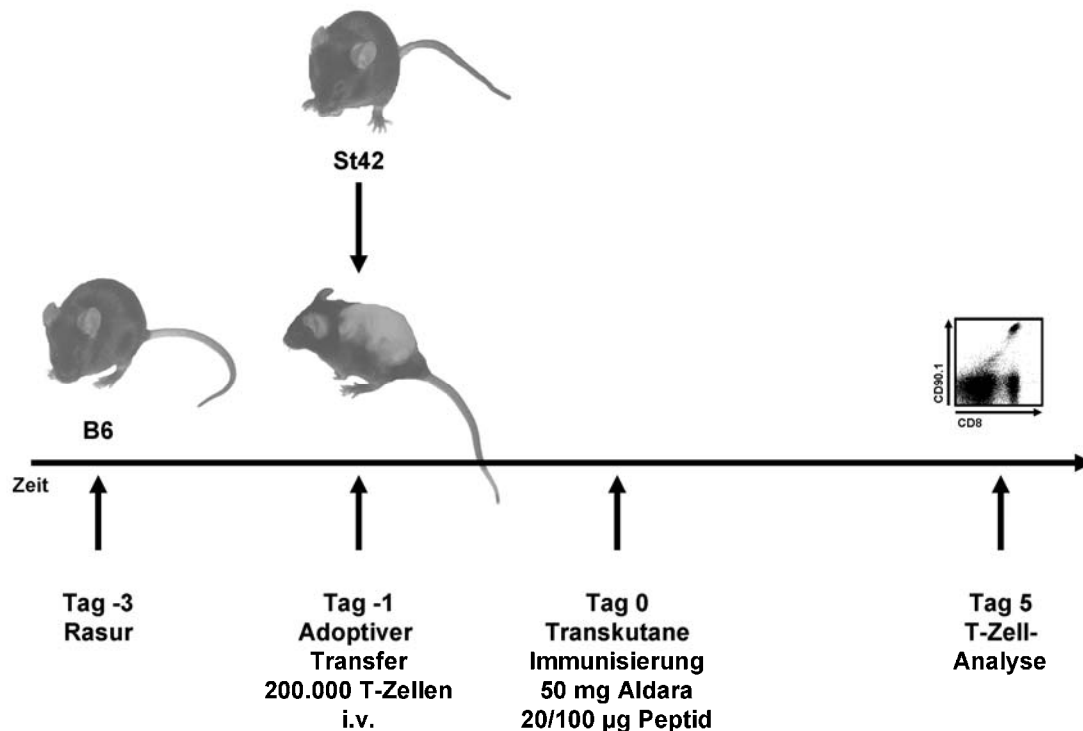


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs bei der transkutanen Immunisierung

Wie in Abbildung 5.3 gezeigt ist, resultierte der bloße Transfer der St42-Zellen in einen Anteil von 0,35 % der St42-Zellen an der Gesamtzahl der CD8-positiven T-Zellen in der Milz. Wurde das Peptid allein, also ohne Adjuvans verabreicht, so führte das zu einer leichten Proliferation der St42 Zellen (2,41 % der CD8⁺-T-Zellen). Diese Zellen zeigen im Bezug auf die CD62L- und CD44-Expression einen nicht vollständig

aktivierten Phänotyp (nicht gezeigt). Wurde dagegen mit SGPSNTPPEI-DCs immunisiert, kam es zu einer deutlichen Proliferation der St42-Zellen, so stellen die St42 T-Zellen 21,7 % aller CD8-positiven Zellen der Milz. Alle St42-Zellen zeigen einen vollständig aktivierten Phänotyp (nicht gezeigt).

Die Analyse der Splenozyten der transkutan immunisierten Mäuse ließ deutlich erkennen, dass Aldara sich als Adjuvans für Peptid-Immunisierungen eignete. Es kam in allen Gruppen zu einer sehr starken Vermehrung der St42-Zellen (etwa 50 % der CD8⁺-T-Zellen). Diese Zellen zeigten darüber hinaus einen vollständig aktivierten Phänotyp (nicht gezeigt). Es ließ sich außerdem erkennen, dass das auf den Rücken gecremte Peptid in ausreichender Menge durch das Stratum Corneum diffundierte und zum Beladen der DCs in der Haut ausreichte, die Injektion des Peptids führte also im Vergleich dazu zu keiner Verbesserung der Antwort.

Es lässt sich also festhalten, dass diese Variante der transkutanen Immunisierung prinzipiell funktioniert und dass 20 µg Peptid sowie etwa 50 mg Aldara-Creme bei einmaliger Applikation ausreichen um im St42-Adoptiv-Transfer-Modell eine zumindest phänotypische Aktivierung der transgenen CTLs zu erzielen.

5. Ergebnisse – Transkutane Immunisierung

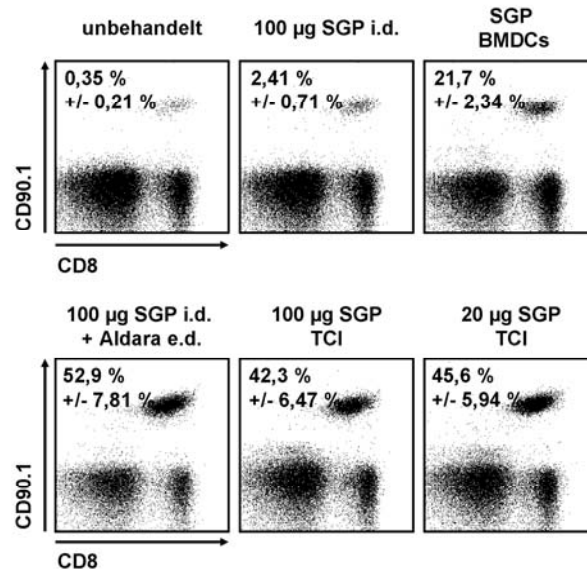


Abbildung 5.3: St42-T-Zellen lassen sich durch transkutane Immunisierung aktivieren.

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren je 50 mg Aldara mit 20 beziehungsweise 100 µg SGPSNTPPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. Weiteren Tieren wurden 100 µg SGPSNTPPEI intradermal injiziert, einigen dieser Tiere wurden zusätzlich 50 mg Aldara aufgetragen. Außerdem wurde eine Gruppe nicht behandelt. Eine weitere Gruppe wurde mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen aus den Tieren entnommen und mit α -CD8-APC-Cy7- und α -CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD90.1 der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit 2 beziehungsweise 3 Mäusen pro Gruppe.

Im Folgenden sollte nun die induzierte St42-CTL-Antwort genauer charakterisiert werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob die aktivierten CTLs auch lytisch aktiv waren. Hierzu wurden 200.000 St42-T-Zellen adoptiv in B6-Mäuse transferiert und die Mäuse wie zuvor beschrieben rasiert und mit 20 µg SGPSNTPPEI-Peptid in etwa 50 mg Aldara-Creme immunisiert. Als Negativ-Kontrolle diente hier eine Gruppe von Mäusen die nicht behandelt wurden, eine Gruppe von Tieren die mit 50 mg Aldara behandelt wurden, sowie eine Gruppe, in der die Mäuse nur 20 µg SGPSNTPPEI intradermal injiziert bekamen. Die transkutane Immunisierung sollte zudem mit einer DC-Immunisierung verglichen werden, dazu wurde eine Gruppe mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und SGPSNTPPEI-beladenen (100 nM) BMDCs i.p. immunisiert. Zudem wurde erneut einer Gruppe von Tieren 20 µg SGPSNTPPEI Peptid intradermal injiziert und Aldara über den entsprechenden Bereich gecremt. 4 Tage nach der Immunisierung wurde die CTL-Antwort mit Hilfe eines *in vivo* Zytotoxizitätstest auf

Ihre Funktionalität hin überprüft. Wie in Abbildung 5.4 gezeigt ist, wurden die Peptid-beladenen Zielzellen zu annähernd 100% in den transkutan immunisierten Mäusen innerhalb von 16 Stunden lysiert. Die gleiche lytische Aktivität fand sich in den Mäusen, die mit Aldara eingecremt wurden und denen zudem SGPSNTPPEI i.d. injiziert wurde. Beide Antworten waren mit der durch die DC-Immunisierung erzielten Antwort vergleichbar. Deutlich zu erkennen war, dass weder die Applikation von Aldara alleine noch die alleinige Injektion von SGPSNTPPEI-Peptid zu einer detektierbaren Lyse der Peptid-beladenen Zielzellen führt.

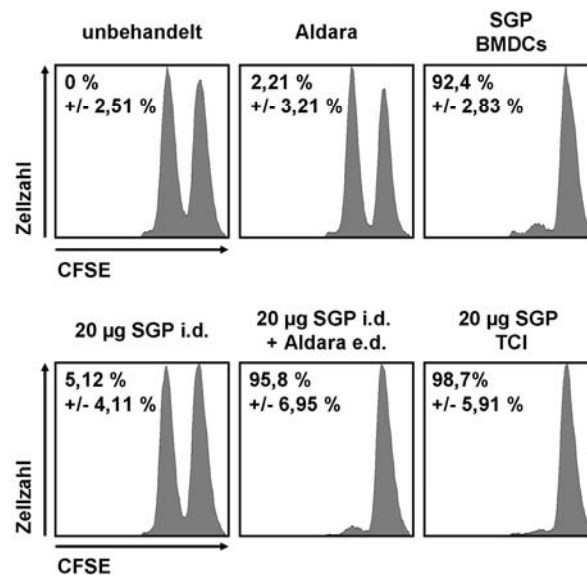


Abbildung 5.4: Die durch die Transkutane Immunisierung aktivierte St42-T-Zellen sind lytisch aktiv.

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren 50 mg Aldara mit 20 µg SGPSNTPPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. Weiteren Tieren wurden 20 µg SGPSNTPPEI intradermal injiziert, einigen dieser Tiere wurden zusätzlich 50 mg Aldara aufgetragen. Außerdem wurde eine Gruppe nicht beziehungsweise nur mit Aldara behandelt. Eine weitere Gruppe wurde mit 1.000.000 p(I:C)-aktivierten und mit 100 nM SGPSNTPPEI-beladenen BMDCs i.p. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard *in vivo* Zytotoxizitätstest überprüft. 16 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die jeweiligen CFSE-Signale der unterschiedlich behandelten Mäuse. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse sowie den absoluten Fehler aus 2 Werten an. Dargestellt sind repräsentative Einzelanalysen aus einem von 2 Experimenten mit jeweils 2 Mäusen pro Gruppe.

Nachdem der *in vivo* Zytotoxizitätstest keine Rückschlüsse darauf zuließ, ob tatsächlich die transgenen T-Zellen für die Lyse der Zielzellen verantwortlich waren, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die aktivierten T-Zellen in der Lage waren, nach Peptid-Restimulation IFN- γ zu produzieren. Hierdurch ließ sich die Effektivität der transkutanen Immunisierung genauer definieren, zudem erlaubte eine intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse der IFN- γ -Produktion die genaue

Identifizierung der IFN- γ -produzierenden Zellen. Entsprechend wurden die Milzzellen aus adoptiv transferierten und transkutan immunisierten Mäusen nach *ex vivo* Peptid-Restimulation durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abbildung 5.5 gezeigt, fanden sich 4 Tage nach der transkutanen Immunisierung IFN- γ -produzierende St42-T-Zellen in der Milz. Die IFN- γ -Produktion ließ sich dabei lediglich in den Zellen detektieren, die mit SGPSNTPPEI restimuliert wurden, die Produktion von IFN- γ war also, ebenso wie die lytische Aktivität, antigenspezifisch.

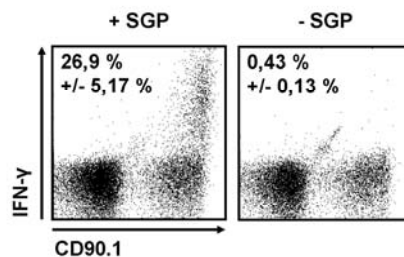


Abbildung 5.5: Die durch die transkutane Immunisierung aktivierten St42-T-Zellen produzieren nach *ex vivo* Peptid-Restimulation IFN- γ .

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren 50 mg Aldara mit 20 μ g SGPSNTPPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. 5 Tage nach der Immunisierung wurden den Mäusen die Milzen und Lymphknoten entnommen und für 6 Stunden mit beziehungsweise ohne SGPSNTPPEI in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit α -CD8-PE- und α -CD90.1-PerCP-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α -IFN- γ -APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN- γ - und CD90.1-Signal auf CD8⁺-Lymphozyten mit beziehungsweise ohne vorherige Peptid-Restimulation. Die Zahlen geben den Anteil der IFN- γ ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der jeweiligen transgenen CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 2 bis 3 Mäusen pro Gruppe.

5.1.2 St42-CTLs proliferieren innerhalb der ersten 48 Stunden nach transkutaner Immunisierung in den drainierenden Lymphknoten und verteilen sich danach systemisch

Wie in Abbildung 5.6 dargestellt zeigte die Analyse der peripheren Blutlymphozyten sowie der Lymphknotenzellen und Milzzellen einer transkutan immunisierten Maus, dass die aktivierten T-Zellen am vierten Tag nach der Immunisierung systemisch auftreten.

5. Ergebnisse – Transkutane Immunisierung

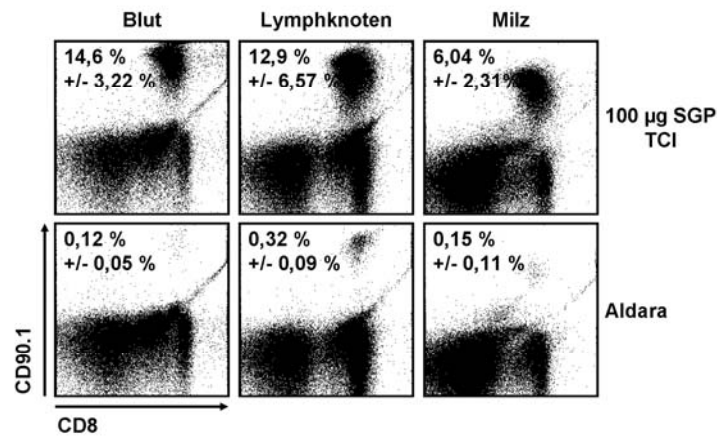


Abbildung 5.6: Die transkutane Immunisierung induziert eine systemische CTL-Antwort.

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren 50 mg Aldara mit 20 µg SGPSNTPPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. Eine andere Gruppe von Tieren wurde dagegen lediglich mit 20 mg Aldara behandelt. 5 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut, die Milz und die Lymphknoten entnommen und mit α-CD8-APC-Cy7- und α-CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und CD90.1 der PI⁻-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der CD90.1-positiven Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit 2 beziehungsweise 3 Mäusen pro Gruppe.

Um ein detaillierteres Bild der zeitlichen Abläufe bei der transkutanen Immunisierung zu erlangen, sollte die Expansion und die Verteilung der transgenen T-Zellen sowie deren Aktivierungszustand im zeitlichen Verlauf nach der transkutanen Immunisierung verfolgt werden. Dazu wurden 200.000 St42-T-Zellen adoptiv in rasierte B6-Mäuse transferiert. Diese wurden in verschiedene Gruppen unterteilt und jeweils im Abstand von je einem Tag transkutan immunisiert, außerdem wurde jeweils eine Gruppe von Tieren nur mit Aldara behandelt. Am sechsten Tag wurden die Tiere getötet und der Anteil der transgenen Zellen an den CD8⁺-T-Zellen in Blut, Milz und drainierenden Lymphknoten bestimmt. In Abbildung 5.7 ist zu sehen, dass sich bereits 48 Stunden nach der Immunisierung eine deutliche Zunahme der transgenen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten messen ließ. Vier Tage nach der Immunisierung war das Maximum der Antwort erreicht und die Anzahl der Zellen ging ab dem fünften Tag zurück. Im Vergleich dazu waren in der Milz und im Blut erst ab dem dritten Tag nach der Immunisierung deutliche Mengen an transgenen T-Zellen zu finden, auch hier ging die Anzahl der Effektorzellen ab dem fünften Tag deutlich zurück. Es zeigte sich also, dass die St42-Zellen zunächst in den drainierenden Lymphknoten proliferierten und sich von dort aus systemisch verteilten. Ob die Zellen auch in der Milz proliferierten oder ob nach 48 Stunden bereits die

5. Ergebnisse – Transkutane Immunisierung

ersten Zellen aus den Lymphknoten in die Milz auswanderten ließ sich hier nicht klären.

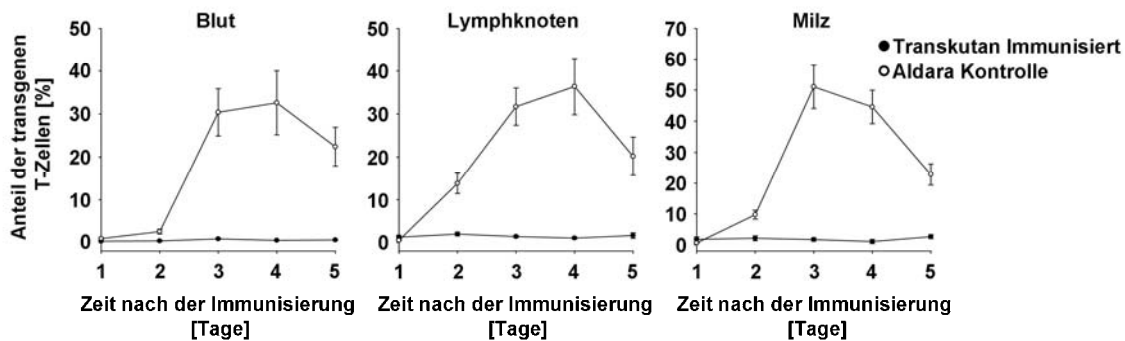


Abbildung 5.7: Die durch die Transkutane Immunisierung induzierte St42-Antwort erreicht ihr Maximum am 3. und 4. Tag nach der Immunisierung.

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren 50 mg Aldara mit 20 µg SGPSNTPPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. Eine andere Gruppe von Tieren wurde dagegen lediglich mit 20 mg Aldara behandelt. An verschiedenen Tagen nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut, die Lymphknoten und die Milz entnommen und mit α-CD8-APC-Cy7- und α-CD90.1-PE-Cy7-Antikörpern zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt. Gezeigt ist der Anteil der transgenen T-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population zum jeweiligen Zeitpunkt in den verschiedenen Organen aus transkutan immunisierten (offene Symbole) und nur mit Aldara behandelten (gefüllte Symbole) Mäusen. Angegeben sind das Mittel sowie die Standardabweichung aus je 3 gemessenen Werten.

Ein ähnliches Bild erhielt man, wenn man die Effektorfunktion der aktivierten T-Zellen in den Lymphknoten und der Milz beobachtete. So wurden die Milz- und Lymphknotenzellen der Tiere über den entsprechenden Zeitraum hinweg auf die Produktion von IFN-γ hin getestet. Dazu wurden jeweils 1.000.000 Milz- beziehungsweise Lymphknotenzellen in 96-Kavitäten Rundbodenplatten mit beziehungsweise ohne SGPSNTPPEI-Peptid (100 nM) für 16 Stunden bei 37 °C in T-Zellmedium inkubiert und anschließend die Menge des ausgeschütteten IFN-γ im Zellüberstand per ELISA gemessen. Wie in Abbildung 5.8 gezeigt, ließ sich feststellen, dass sich bereits 48 Stunden nach der Immunisierung Zellen in den Lymphknoten fanden, die SGPSNTPPEI-spezifisch IFN-γ sezernieren. Hier zeigte sich, dass die IFN-γ-Produktion bereits ab dem dritten Tag nach der Immunisierung abnahm und an Tag 4 und 5 praktisch gar nicht mehr messbar war. In der Milz fanden sich bereits nach 48 Stunden die ersten Effektorzellen, hier erreichte die Antwort am dritten Tag das Maximum und war schließlich 5 Tage nach der Immunisierung nicht mehr nachweisbar.

Diese Daten ließen also darauf schließen, dass die Zellen bereits innerhalb der ersten 48 Stunden stark proliferierten und nach 48 Stunden bereits funktionelle

Effektorzellen generiert wurden. Diese verteilten sich ab dem dritten Tag systemisch und behielten über zwei bis drei Tage hinweg volle Funktionalität bevor die Antwort ab dem vierten Tag nach der Immunisierung wieder zurückging.

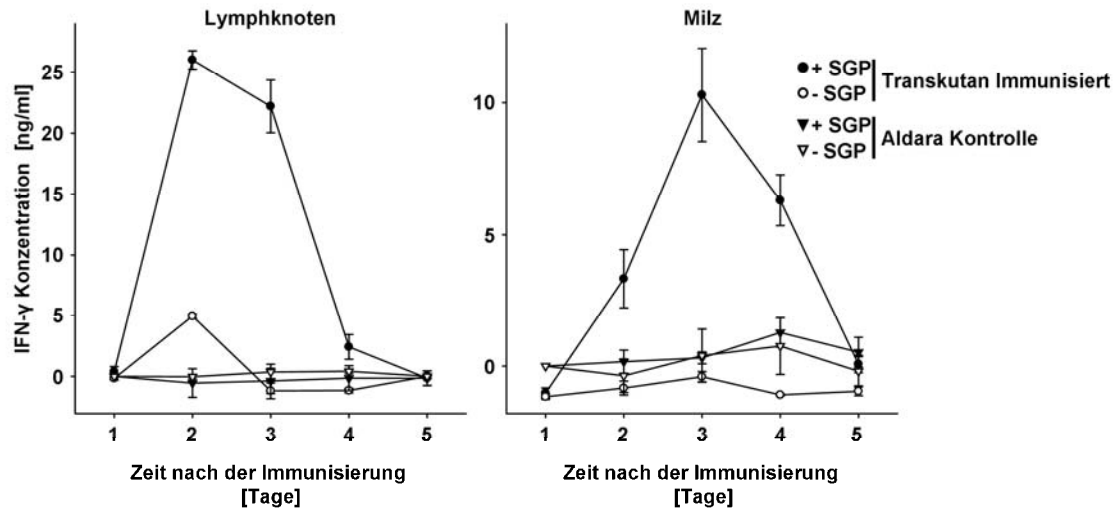


Abbildung 5.8: Die durch die transkutane Immunisierung aktivierten St42-T-Zellen sind ab dem 2. Tag nach der Immunisierung funktionell.

200.000 CD8⁺-St42-Milzzellen wurden in zuvor rasierte B6-Mäuse adoptiv transferiert. 24 Stunden später wurde den Tieren 50 mg Aldara mit 20 µg SGPSNTPEI gemischt auf den rasierten Rücken aufgetragen. Eine andere Gruppe von Tieren wurde dagegen lediglich mit 20 mg Aldara behandelt. An verschiedenen Tagen nach der Immunisierung wurden den Mäusen die Lymphknoten und die Milz entnommen. Jeweils 1.000.000 Zellen wurden für 16 Stunden mit (gefüllte Symbole) beziehungsweise ohne (offene Symbole) SGPSNTPEI (100 nM) in einer 96-Kavitätenplatte inkubiert. Die Konzentration an IFN-γ in den Zellüberständen wurde mittels eines Standard ELISA gemessen. Gezeigt ist die IFN-γ-Konzentration im Zellüberstand der zum jeweiligen Zeitpunkt entnommenen verschiedenen Organen aus transkutan immunisierten (Kreise) und nur mit Aldara behandelten (Dreiecke) Mäusen. Angegeben sind das Mittel sowie die Standardabweichung aus je 3 gemessenen Werten.

5.1.3 24 Stunden nach der transkutaner Immunisierung findet sich das Antigen im drainierenden Lymphknoten wieder

Entsprechend der Kinetik der Proliferation der St42-Zellen ergab sich die Frage, wann das Antigen die Lymphknoten erreicht und ab welchem Zeitpunkt somit die Aktivierung der T-Zellen begann. Um diese Frage zu beantworten wurde erneut auf das St42-Modell zurückgegriffen. Nachdem sich bei dem *in vivo* Modell bei der Betrachtung der drainierenden Lymphknoten lediglich bestimmen ließ, wann die CD8⁺-Zellen anfangen zu proliferieren, sich jedoch nicht feststellen ließ, wann das Antigen, beziehungsweise die Antigenpräsentierenden Zellen den Lymphknoten erreichten und somit die Interaktion mit den T-Zellen beginnen konnte, wurde für dieses Problem ein gemischtes *in vivo* und *in vitro* Modell verwendet. So wurden B6-

Mäuse transkutan mit SGPSNTPPEI-Peptid immunisiert und die Lymphknoten nach 24 beziehungsweise 48 Stunden entnommen und als Antigenpräsentierende Zellen in einem Thymidin-Proliferationsansatz mit St42-Zellen verwendet. Hierfür wurden die Lymphknotenzellen in titrierten Mengen mit konstanten Mengen von St42-T-Zellen in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten für 72 Stunden inkubiert und die Inkorporation von Tritium markiertem Thymidin während der letzten 24 Stunden gemessen. Die *in vitro* Proliferation der St42-Zellen war somit ein Indikator für das Vorhandensein des entsprechenden Antigens in den Lymphknoten.

Wie in Abbildung 5.9 zu sehen ist, fand sich bereits nach 24 Stunden genug Antigen für die *in vitro* Aktivierung der transgenen T-Zellen. Entsprechend der titrierten Menge der Antigenpräsentierenden Zellen nahm auch die Proliferation ab. Es war deutlich zu erkennen, dass nach 48 Stunden weniger Antigen in den Lymphknoten zu finden war, es ließ sich also festhalten, dass bereits nach etwa 24 Stunden der größte Teil des Antigens im Lymphknoten ankam und zu späteren Zeitpunkten kein beziehungsweise deutlich weniger Antigen in den Lymphknoten gelangte. Lymphknotenzellen aus SIINFEKL immunisierten Mäusen führten zu keiner Proliferation der St42-T-Zellen (nicht gezeigt).

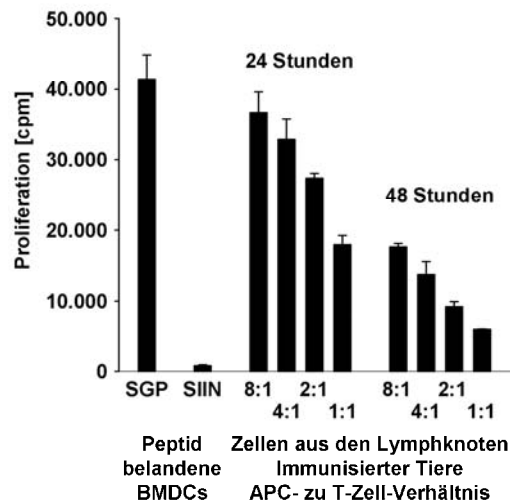


Abbildung 5.9: Das bei der transkutanen Immunisierung applizierte Antigen findet sich 24 Stunden nach der Immunisierung im drainierenden Lymphknoten.

50 mg Aldara mit 100 µg SGPSNTPPEI gemischt wurden auf den rasierten Rücken von B6-Mäusen aufgetragen. 24 beziehungsweise 48 Stunden nach der Applikation wurden den Mäusen die Lymphknoten entnommen und die erhaltenen Zellen in einem Verhältnis von 8:1, 4:1, 2:1 und 1:1 mit je 40.000 St42-CD8⁺-T-Zellen in einer 96-Kavitätenplatte inkubiert. Zudem wurden St42-T-Zellen mit BMDCs inkubiert, die mit SGPSNTPPEI oder SIINFEKL beladen waren. Nach 2 Tagen wurde pro Kavität mit 0,5 µCi ³H-markiertes Thymidin zugegeben, nach weiteren 24 Stunden wurde das eingebaute Thymidin mittels eines α-Zählers gemessen. Dargestellt sind die gemessenen Ereignisse pro Minute (cpm) in den verschiedenen Proben. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert aus 3 Messungen sowie die entsprechende Standardabweichung. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Ausgehend von den hier beschriebenen Beobachtungen im transgenen Modell, wurde von Tobias Warger ein Immunisierungsprotokoll zur Aktivierung endogener CD8⁺-T-Zellen in Wild-Typ-Mäusen erarbeitet. Hierzu verwendete er das SIINFEKL-Peptid aus dem Ovalbumin. Er konnte zeigen, dass sich mit einem ähnlichen Protokoll SIINFEKL spezifische endogene T-Zellen aktivieren ließen. Diese zeigten lytische Aktivität und antigenspezifische IFN-γ-Produktion nach Restimulation *ex vivo* (Rechtsteiner et al., 2005), außerdem zeigten seine Studien, dass die Antwort 7 Tage nach der Immunisierung ihr Maximum erreicht, danach wieder abfällt und nach etwa 15 Tagen nur noch schwer nachzuweisen ist (Warger 2006, Manuskript im Druck). Im Folgenden sollte die Funktionalität der mittels Transkutaner Immunisierung induzierten endogenen Antwort gegen das SIINFEKL-Peptid ausführlicher charakterisiert werden.

5.2 Tumorprotektive Kapazität einer transkutan induzierten CTL-Antwort im transgenen Tumormodell

Neben der Analyse der Anzahl der Effektorzellen, deren lytischer Aktivität und deren Fähigkeit *ex vivo* nach Restimulation IFN- γ zu produzieren, sollte in einem *in vivo* System die Funktionalität der induzierten Antwort getestet werden. Hierzu eignen sich im Prinzip 2 Methoden. Zum einen kann in einem Infektionsmodell getestet werden, ob eine Immunisierung der Tiere diese vor einer Virus- oder Bakterieninfektion schützt, beziehungsweise die Infektion in ihrem Umfang deutlich reduziert. Hierzu sind entweder transgene Infektionsmodelle, bei denen die Pathogene ein bestimmtes Modellantigen exprimieren oder Infektionsmodelle bei denen protektive Antigene des Pathogens selbst bekannt sind und zur Immunisierung herangezogen werden können geeignet.

Zum anderen boten sich verschiedene Tumormodelle an. Neben wenigen autochthonen Modellen, bei denen die Tumore spontan entstehen, werden Tumorzellen in den meisten Fällen implantiert. Hier sind die Tumore entweder transgen für bestimmte Modellantigene oder hinreichend spezifiziert, sodass Tumorantigene bekannt sind.

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst zwei Modelle ins Auge gefasst, ein im Institut für Virologie etabliertes Virusmodell, sowie das OVA transgene EG.7-Thymommodell.

In ersten Vorversuchen zeigte sich rasch, dass sich das Virusmodell nicht eignete, da bereits die Anwendung der Aldara-Creme alleine Protektion hervorrief und so kein signifikanter Unterschied zu den transkutan immunisierten Tieren zu beobachten war. Aus diesem Grunde wurde die Effektivität der transkutanen Immunisierung mittels des EG.7-Thymommodells überprüft.

Bei der EG.7-Tumorlinie handelt es sich um eine transgene Variante einer Thymomzelllinie, der so genannten EL4-Linie. Diese wurde aus einer B6-Maus isoliert. Diese Linie sollte also von B6-Mäusen als Selbst-Gewebe erkannt und toleriert werden. Die Integration des OVA Gens jedoch fügt dem Antigenrepertoire der Tumorlinie Fremdatigene hinzu, gegen die sich eine Antwort induzieren lässt. In den folgenden Versuchen wurden die Mäuse also mit dem SIINFEKL-Peptid immunisiert und die Wirkung der SIINFEKL-spezifischen CTLs auf das Tumorstadium beobachtet.

5.2.1 Die transkutane Immunisierung führt zu einem reduzierten Tumorstadium in therapeutischen Tumormodell

Die Effektivität der transkutanen Immunisierung sollte hier zunächst in einem therapeutischen Ansatz getestet werden. So wurden in B6-Mäuse jeweils 400.000 EG.7 Zellen subkutan implantiert und die Tiere nach 12 Tagen transkutan immunisiert (4 x 100 µg SIINFEKL + 50 mg Aldara, alle 12 Stunden). So sollten die Tumore also zum Zeitpunkt der Immunisierung bereits angewachsen und annähernd so groß gewesen sein, dass sie sich durch die Haut ertasten ließen. Neben den immunisierten Mäusen wurde eine Kontrollgruppe mit Mäusen integriert, die lediglich mit Aldara behandelt wurden (entsprechend 4 x 50 mg Aldara), da mit anti-tumoralen Effekten nach Aldara-Behandlung gerechnet werden musste (Coors et al., 2006; Sapijaszko, 2005).

Die Mäuse wurden nach der Immunisierung 3-mal wöchentlich auf Tumore hin untersucht und auftretende Tumore mit einer Schieblehre vermessen. Erreichte der Durchmesser eines Tumors eine Größe von 20 mm so wurden die Mäuse getötet.

Wie in Abbildung 5.10 A gezeigt ist, mussten alle Mäuse, die nur mit Aldara-Creme behandelt wurden, nach 25 bis 33 Tagen getötet werden. Dies entsprach der Überlebensdauer gänzlich unbehandelter Mäuse (nicht gezeigt). Im Vergleich dazu überlebten 40 % der Mäuse den Versuch, ohne jegliches Tumorstadium zu zeigen. Die transkutan immunisierten Mäuse, in denen der Tumor wuchs, zeigten im Vergleich zu den Aldara-behandelten Mäusen eine verlängerte Überlebensdauer. Es ließ sich also ein deutlich Tumor-protektiver Effekt der transkutanen Immunisierung erkennen. Das Auswachsen des Tumors war nicht auf den Verlust des SIINFEKL-Epitops auf den Tumorzellen zurückzuführen, da alle ausgewachsenen Tumore das SIINFEKL-Peptid präsentierten (nicht gezeigt).

Im nächsten Versuch wurde die Zeit, die der Tumor zum Anwachsen hatte, verkürzt, um zu überprüfen, ob weniger etablierte Tumore gänzlich von der durch die transkutane Immunisierung induzierten Antwort kontrolliert werden konnten. Der Versuchsaufbau wurde also dahingehend verändert, dass die Mäuse früher immunisiert wurden. So verstrichen zwischen Tumornokulation und Immunisierung lediglich 5 Tage. Wie in Abbildung 3.10 B zu sehen ist war die Überlebensdauer der nur mit Aldara behandelten Mäuse mit den Ergebnissen aus dem ersten Versuch vergleichbar. Entsprechendes galt für die immunisierten Mäuse, erneut überleben 40 % der Tiere den Versuch ohne messbares Tumorstadium. Es zeigt sich jedoch,

dass die Tumor tragenden immunisierten Mäuse länger überlebten. Die frühere Immunisierung erlaubte der CTL-Antwort also eine verbesserte Kontrolle des Tumorwachstums, es kam jedoch in 60 % der Fälle zum Auswachsen des Tumors.

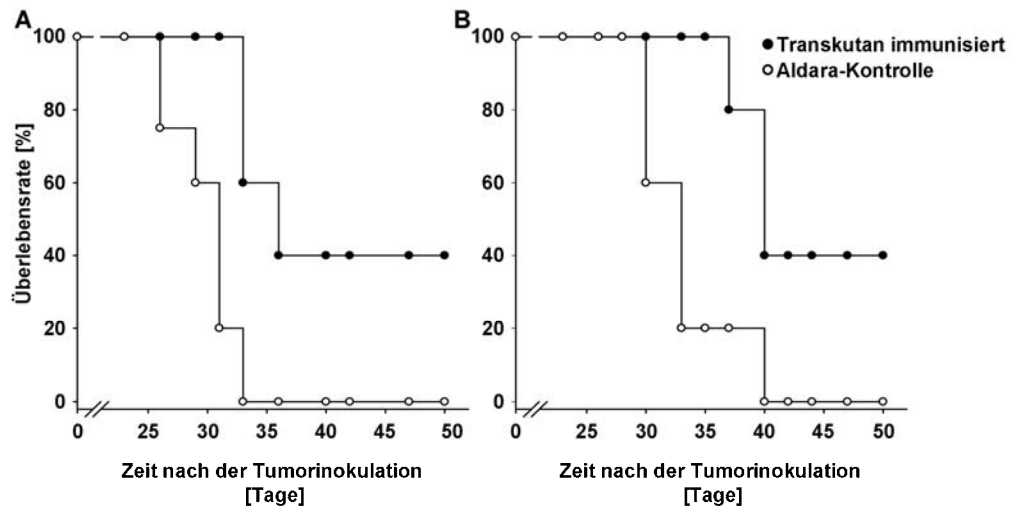


Abbildung 5.10: Die transkutane Immunisierung von B6-Mäusen mit SIINFEKL vermittelt eine teilweise Protektion in einem therapeutischen EG.7 Tumormodell.

Jeweils 5 B6-Mäusen pro Gruppe wurden 400.000 EG.7 Tumorzellen s.c. implantiert. 12 (A) beziehungsweise 5 (B) Tage nach der Inokulation wurde je eine Gruppe innerhalb von 36 Stunden 4-mal mit 100 µg SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Eine andere Gruppe wurde entsprechend lediglich mit 50 mg Aldara behandelt. Das Tumorwachstum wurde beobachtet und die Tumorgöße in 2 Dimensionen mit einer Schieblehre gemessen. Tiere bei denen die Größe des Tumors 20 auf 20 mm erreichte wurden getötet. Dargestellt ist der Anteil der überlebenden Tiere gegen die Zeit nach der Tumordinokulation. Am jeweiligen Versuchende waren alle verbleibenden Mäuse tumorfrei.

5.2.2 Die transkutane Immunisierung induziert eine protektive Antwort in einem prophylaktischen Tumormodell

Nachdem sich in den therapeutischen Ansätzen eine gewisse protektive Kapazität der transkutanen Immunisierung gezeigt hatte, sollte in einem prophylaktischen Ansatz untersucht werden, ob eine der Tumordinokulation vorausgehende Immunisierung das Anwachsen eines Tumors gänzlich verhindern kann.

Hierzu wurden B6-Mäuse zunächst wie oben beschrieben transkutan immunisiert. 5 Tage später wurden die Tumorzellen inokuliert.

Wie in Abbildung 5.11 A dargestellt ist, wuchsen die Tumore in der Kontrollgruppe wie zuvor beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass alle immunisierten Mäuse den Versuch ohne messbares Tumorwachstum überstanden. Wurde also vor der Tumordinokulation immunisiert, konnten die injizierten Tumorzellen direkt von den

T-Zellen attackiert und vollständig beseitigt werden, sodass das Anwachsen des Tumors sofort unterbunden wurde.

Um zu überprüfen, wie lange die tumorprotektive Antwort vor dem Anwachsen von inokulierten Tumoren schützt, wurde den überlebenden Tieren 50 Tage nach der Immunisierung erneut ein Tumor inokuliert. Zudem wurde eine Gruppe in den Versuch integriert, die wie zuvor beschrieben lediglich mit Aldara behandelt wurde. Hier ließ sich die zuvor beobachtete Überlebensdauer beobachten. Wie in Abbildung 5.11 B zu sehen ist, reichte die induzierte Antwort nicht aus, um alle Tiere vor einem erneuten inokulierten Tumor zu schützen, so überlebten nur 60 % der erneut inokulierten Tiere.

Zusammengefasst zeigte sich also, dass die Transkutane Immunisierung nur im prophylaktischen Tumormodell volle Protektion vermittelt. Es zeigte sich zudem, dass die induzierte Antwort nicht ausreicht um einen langfristigen Schutz zu gewährleisten. Im Vergleich dazu wird in therapeutischen Ansätzen nur ein teilweiser und unzuverlässiger Schutz erzielt.

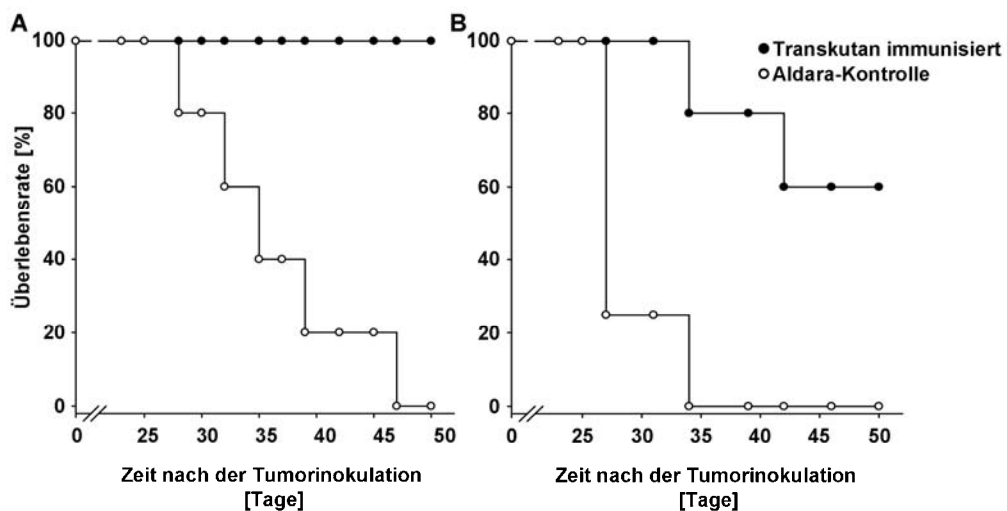


Abbildung 5.11: Die transkutane Immunisierung von B6-Mäusen mit SIINFEKL vermittelt eine volle Protektion in einem prophylaktischen EG.7 Tumormodell.

Jeweils 5 B6-Mäusen pro Gruppe wurden innerhalb von 36 Stunden 4-mal mit 100 µg SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Eine andere Gruppe wurde entsprechend lediglich mit 50 mg Aldara behandelt. 5 Tage (A) nach der Immunisierung wurden je 400.000 EG.7 Tumorzellen s.c. implantiert. Das Tumorwachstum wurde beobachtet und die Tumorgöße in 2 Dimensionen mit einer Schieblehre gemessen. Tiere bei denen die Größe des Tumors 20 auf 20 mm erreichte wurden getötet. Mäuse die diese Tumorinokulation überstanden hatten wurden weitere 70 Tage später (B), zusammen mit einer mit Aldara behandelten Gruppe, erneut mit 400.000 EG.7 Zellen inokuliert und das Tumorwachstum beobachtet. Zusehen ist der Anteil der überlebenden Tiere gegen die Zeit nach der Tumorinokulation. Am jeweiligen Versuchende waren alle verbleibenden Mäuse tumorfrei.

5.3 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die CTL-Antwort nach transkutane Immunisierung

In verschiedenen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Immunreaktionen spielen (Khazaie and von Boehmer, 2006). Diese Zellen bilden das Fundament der peripheren Toleranz und dienen im Wesentlichen der Eindämmung autoreaktiver Immunantworten. In Infektionsmodellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die T_{reg} auch Antworten gegen Fremdartigene beeinflussen (Rouse et al., 2006; Suvas and Rouse, 2006; Eddahri et al., 2006). Es sollte daher im vorliegenden Modell untersucht werden, ob diese Zellen die Aktivierung der CTLs per transkutane Immunisierung ebenfalls beeinflussen.

Klassischerweise werden bei Experimenten zur Funktion der T_{reg} *in vivo* Antikörper eingesetzt, die die Zellen depletieren, oder die deren Funktion inhibieren. So lässt sich durch das Fehlen dieser Zellen beziehungsweise deren Funktionslosigkeit abschätzen, welchen Einfluss sie auf die Induktion einer Antwort haben (Turk et al., 2004; Ko et al., 2005; Suvas et al., 2003).

5.3.1 Die Injektion des PC61-Antikörpers führt zu einer Verstärkung der durch die transkutane Immunisierung induzierten CTL-Antwort

Die so genannten natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen zeichnen sich durch hohe Expression des CD25-Moleküls aus (Sakaguchi et al., 1995). Dieses Oberflächenmolekül dient daher der Identifizierung dieser Zellpopulation. Entsprechend macht man sich in naiven Mäusen die spezifische CD25-Expression zunutze und depletiert die T_{reg} *in vivo* durch Gabe monoklonaler Antikörper gegen CD25. Am besten beschrieben ist hier der Klon PC61 (Suvas et al., 2003; Turk et al., 2004). Im Folgenden wurde dieser Antikörper eingesetzt um vor der transkutanen Immunisierung die T_{reg} aus dem System zu entfernen.

Vier Tage vor der Immunisierung wurden 500 µg des PC61-Antikörpers i.p. injiziert, um eine Depletion der regulatorischen T-Zellen am Tag der ersten Immunisierung zu erreichen. Um die Effizienz der PC61-Injektion zu überprüfen, wurde Mäusen vier Tage nach der Antikörper-Injektion Blut abgenommen und mittels Durchflusszytometrie auf T_{reg} hin überprüft. Wie in Abbildung 5.12 zu sehen ist, führte

die Injektion des Antikörpers wie erwartet zu einem nahezu vollständigen Verschwinden der CD25⁺CD4⁺-T-Zellen in der Peripherie der Tiere.

Im Vergleich zur deutlich erkennbaren CD25⁺CD4⁺-Population zeigte sich, dass in den unbehandelten Mäusen nur sehr wenige CD25⁺CD8⁺-T-Zellen vorhanden waren. Solche Zellen wurden zwar vereinzelt in der Literatur beschrieben, es lässt sich jedoch nicht sicher sagen, inwiefern natürlich vorkommende CD8⁺-T_{reg} *in vivo* auftreten und welche Rolle sie spielen (Rifa'i et al., 2004; Bienvenu et al., 2005; Shevach, 2006). Es ließ sich folglich auch nicht sagen, ob eventuell auftretende CD8⁺-T_{reg} ebenfalls CD25 in größerer Menge exprimieren und dementsprechend die Injektion des Antikörpers zu einer Verminderung CD8-positiver T_{reg} führte.

Um zu verhindern, dass der injizierte Antikörper an den CD25-Molekülen gebunden blieb und somit die Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers verhinderte wurde für diese Messungen ein anderer α-CD25-Klon verwendet, dieser konkurriert nicht mit PC61 um das Epitop (nicht gezeigt).

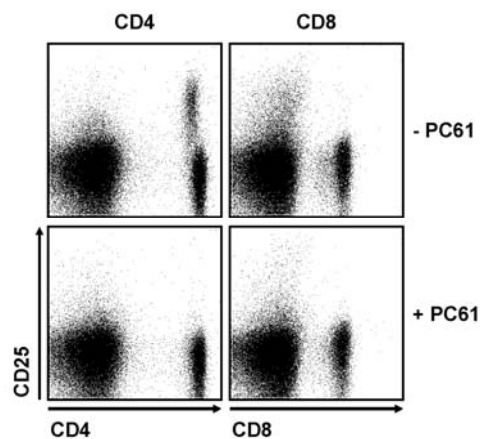


Abbildung 5.12: Die Applikation des PC61-Antikörpers führt zur Depletion von CD25⁺-T-Zellen in der Peripherie von B6-Mäusen.

500 µg des PC61-Antikörpers wurden i.p. in B6-Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden Blutlymphozyten, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten B6-Mäusen zur durchflusszytometrischen Analyse mit α-CD4-PE-Cy7-, α-CD8-APC-Cy7- und α-CD25-PE- (Klon: 7D4) Antikörpern gefärbt. Gezeigt sind die CD4- beziehungsweise CD8- und CD25-Signale auf PI⁻-Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen.

Um den Einfluss der CD4⁺CD25⁺-Zellen auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen bei der transkutanen Immunisierung abzuschätzen, wurde einer Gruppe von Mäusen 4 Tage vor der Immunisierung je 500 µg PC61 Antikörper i.p. injiziert. Im Vergleich dazu wurde eine Gruppe nicht vorbehandelt. Beide Gruppen wurden 2-mal im Abstand von 24 Stunden mit je 50 mg Aldara und 100 µg SIINFEKL transkutan immunisiert. Zusätzlich wurde neben einer nur mit Aldara behandelten Kontrollgruppe

eine Gruppe integriert, bei der den Mäusen zusätzlich zur transkutanen Immunisierung ein agonistischer anti-CD40 Antikörper (Klon FGK-45) i.v. appliziert wurde. Je 100 µg des Antikörpers wurden an den Tagen der Immunisierung sowie am darauf folgenden Tag injiziert. Tobias Warger konnte zuvor zeigen, dass die Applikation dieses Antikörpers zusammen mit der transkutanen Immunisierung eine sehr starke CTL-Antwort induzierte. Diese ließ sich bis zu 35 Tagen nach der Immunisierung nachweisen (Warger 2006, Manuskript im Druck) und sollte hier als Kontrolle für die mit PC61-Gabe erreichte Antwort dienen.

Nach 7 beziehungsweise 35 Tagen wurde im Blut per DimerX-Färbung der Anteil der SIINFEKL-spezifischen T-Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde mittels eines *in vivo* Zytotoxizitätstests und einer *ex vivo* Peptid-Restimulation mit anschließender Intrazellulärfärbung die Funktionalität der CTL-Antwort bestimmt.

Wie in Abbildung 5.13 zu sehen ist zeigte sich 7 Tage nach der Immunisierung deutlich, dass die durch die Gabe des PC61-Antikörpers depletierten Zellen, die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort hemmten, so resultierte die vorherige Applikation des Antikörpers in einer deutlich verstärkten spezifischen Antwort gegen das SIINFEKL-Epitop. Dies ließ sich direkt an dem deutlich erhöhten Anteil an SIINFEKL-spezifischen T-Zellen im Blut erkennen. So verdoppelte sich der Anteil der SIINFEKL-spezifischen Zellen von etwa 1,14 % nach transkutaner Immunisierung auf 3,32 % nach transkutaner Immunisierung mit vorheriger PC61-Gabe. Hier fand sich bei den mit Aldara behandelten Mäusen ein Wert von 0,45 %, bei den zusätzlich mit FGK-45 Antikörpern behandelten Mäusen waren 22,3 % zu messen. Entsprechend nahm die spezifische Lyse der Zielzellen in den ersten 10 Stunden des Zytotoxizitätstest von 21,2 % auf etwa 50 % zu, der Anteil der IFN- γ -produzierenden CD8⁺-T-Zellen stieg von 0,42 auf 1,06 %. Hier waren in den Kontrollen entsprechend 0 % beziehungsweise 97,5 % Lyse und 0,25 % beziehungsweise 12,9 % IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellen zu messen.

5. Ergebnisse – Transkutane Immunisierung

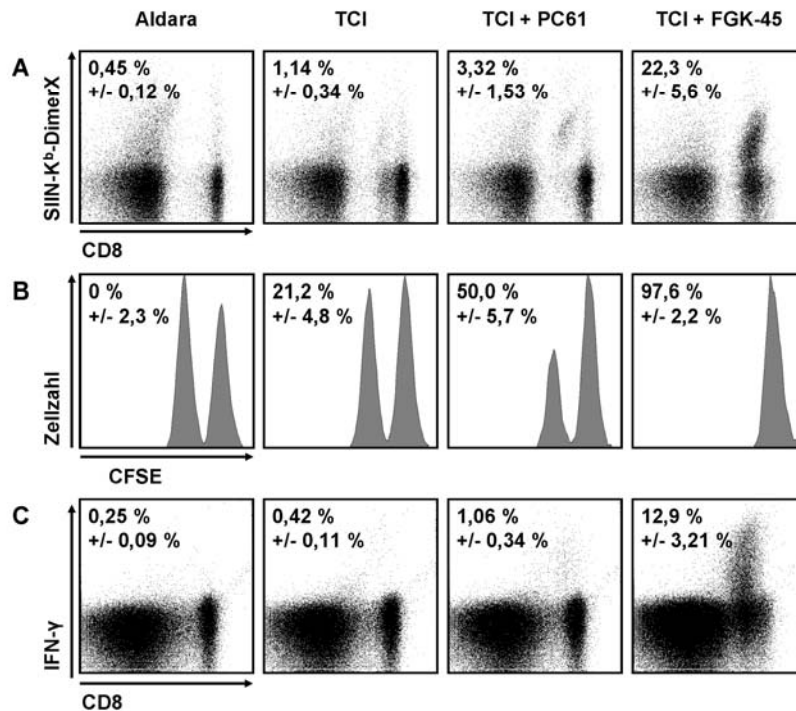


Abbildung 5.13: Die Applikation des PC61-Antikörpers vor der transkutanen Immunisierung führt zu einer verstärkten primären CTL-Antwort.

500 µg des PC61-Antikörpers wurden i.p. in B6-Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden die Mäuse innerhalb von 24 Stunden 2-mal mit 100 µg SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Andere Gruppen wurden lediglich immunisiert, beziehungsweise nur mit Aldara behandelt. Eine weitere Gruppe wurde entsprechend immunisiert, die Mäuse erhielten jedoch mit den Immunisierungen, sowie weitere 24 Stunden später je 100 µg des FGK-45-Antikörpers i.v. appliziert.

A) 7 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und zur durchflusszytometrischen Analyse mit α-CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten SIINFEKL-H2-K^b-DimerX gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und SIINFEKL-H2-K^b-DimerX der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der SIINFEKL-H2-K^b-DimerX⁺-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

B) 7 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard *in vivo* Zytotoxizitätstest überprüft. 10 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die jeweiligen CFSE-Signale der unterschiedlich behandelten Mäuse. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse, sowie Standardabweichung aus 3 Werten an.

C) 8 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milzen entnommen und für 6 Stunden mit SIINFEKL in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit einem α-CD8-PE-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α-IFN-γ-APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN-γ- und CD8-Signal auf den Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN-γ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺-Zellen sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an. Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Betrachtete man, wie in Abbildung 5.14 zu sehen, die induzierten CTL-Antworten 35 Tage nach der Immunisierung, so war zu erkennen, dass die Antwort in den transkutan Immunisierten Mäusen praktisch nicht mehr nachzuweisen war und die gemessenen Werte denen der nur mit Aldara behandelten Mäusen entsprachen. So fanden sich in den Immunisierten Mäusen 0,60 % gegenüber 0,51 % DimerX-positive CD8⁺-Zellen, 7,5 % gegen 0 % spezifische Lyse nach 48 Stunden *in vivo* Zytotoxizitätstest und 0,16 % gegen 0,11 % IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellen nach *ex vivo* Peptid-Restimulation. Im Vergleich dazu ließ sich in den CD25-depletierten und transkutan immunisierten Mäusen selbst nach 35 Tagen eine deutliche CTL-Antwort nachweisen, so waren hier 0,94 % DimerX-positive CD8⁺-T-Zellen zu messen, im Zytotoxizitätstest ließ sich nach 48 Stunden eine 43,2 %ige Lyse der Zielzellen messen, ebenso war mit 0,31 % eine IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellpopulation deutlich zu erkennen. In der FGK-45 Gruppe war jedoch noch eine sehr viel stärkere Antwort zu messen, hier fanden sich 8,00 % DimerX-positive und 1,12 % IFN- γ -produzierende CD8⁺-Zellen. Im Zytotoxizitätstest waren bereits nach 24 Stunden alle Peptid-markierten Zellen lysiert (nicht gezeigt).

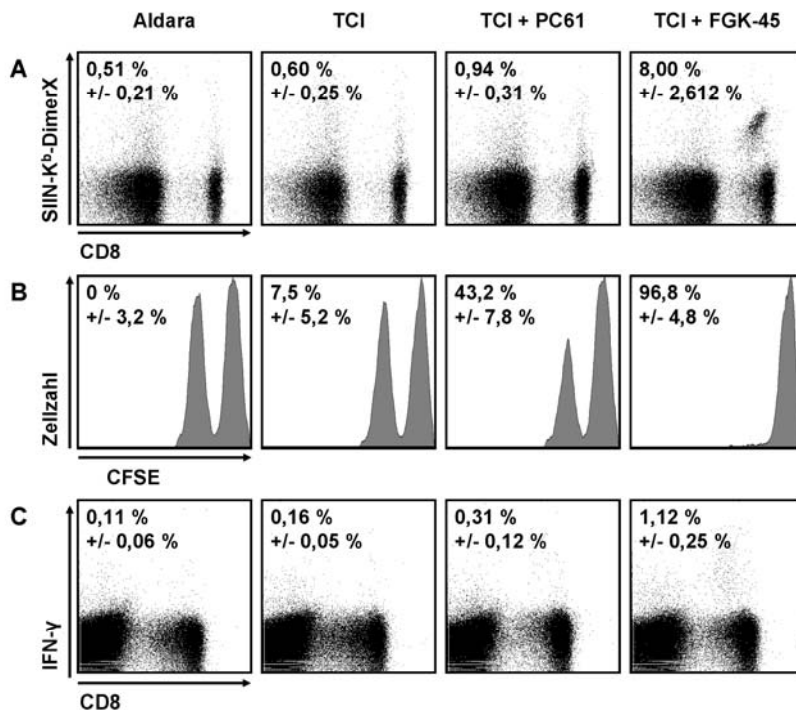


Abbildung 5.14: Die Applikation des PC61-Antikörpers vor der transkutanen Immunisierung induziert eine Gedächtnis-CTL-Antwort.

500 µg des PC61-Antikörpers wurden i.p. in B6-Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden die Mäuse innerhalb von 24 Stunden 2-mal mit 100 µg SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Andere Gruppen wurden lediglich immunisiert, beziehungsweise nur mit Aldara behandelt. Eine weitere Gruppe wurde entsprechend immunisiert, die Mäuse erhielten jedoch mit den Immunisierungen, sowie weitere 24 Stunden später je 100 µg des FGK-45-Antikörpers i.v. appliziert.

A) 35 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und zur durchflusszytometrischen Analyse mit α-CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten SIINFEKL-H2-K^b-DimerX gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und SIINFEKL-H2-K^b-DimerX der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der SIINFEKL-H2-K^b-DimerX⁺-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

B) 35 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard *in vivo* Zytotoxizitätstest überprüft. 48 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die jeweiligen CFSE-Signale der unterschiedlich behandelten Mäuse. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse, sowie Standardabweichung aus 3 Werten an.

C) 37 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen die Milzen entnommen und für 6 Stunden mit SIINFEKL in Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden zunächst mit einem α-CD8-PE-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde in Saponinpuffer mit einem α-IFN-γ-APC-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Gezeigt ist jeweils das IFN-γ- und CD8-Signal auf den Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der IFN-γ⁺-Zellen an der Gesamtzahl der CD8⁺-Zellen, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Wurden zusätzlich zur transkutanen Immunisierung die gleichen Mengen eines zum PC61-Antikörper isotypen Antikörpers appliziert, so glichen die erhaltenen Werte denen aus Mäusen, die nur transkutan immunisiert wurden (nicht gezeigt). Die Wirkung des PC61-Antikörpers ließ sich also nicht auf Effekte einer Antikörperinjektion an sich zurückführen. Umgekehrt ließ sich keine CTL-Antwort messen, wenn PC61-Antikörper zusammen mit Peptid in einer wirkstofffreien Aldara-Formulierung appliziert wurde (nicht gezeigt). Die starke Aktivierung wurde also nur erreicht, wenn die transkutane Immunisierung mit der PC61-Behandlung kombiniert wurde.

Es lässt sich also festhalten, dass CD25⁺-T-Zellen die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort inhibierten. Dieser Effekt ließ sich durch die vorherige Injektion des PC61-Antikörpers unterbinden, so dass es zu einer entsprechend stärkeren Antwort kam.

Hierbei stellte sich nun die Frage ob sich durch die Injektion des Antikörpers die regulatorischen T-Zellen vollständig depletieren ließen, oder ob eventuell noch regulatorische T-Zellen erhalten blieben, die die Antwort noch beeinflussen konnten.

5.3.2 Die Injektion des PC61-Antikörpers führt zur Reduktion der Zahl der regulatorischen T-Zellen, nicht zu deren vollständiger Depletion

Bis vor kurzem war CD25 der einzige bekannte verlässliche Marker für T_{reg} in naiven Mäusen. Es war aber nicht bekannt, ob alle regulatorischen T-Zellen CD25 exprimieren beziehungsweise ob das Expressionslevel für Detektion beziehungsweise Depletion ausreichend ist.

Neben CD25 gilt inzwischen der Transkriptionsfaktor FoxP3 als zuverlässigster Marker für T_{reg}. Seit kurzem erlauben kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen FoxP3 nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen eine zuverlässige Detektion der FoxP3-Expression. Hierbei ergab sich offensichtlich das Problem, dass die Zellen nach Detektion des Markers nicht mehr getestet werden konnten. Mit einer FoxP3-GFP-transgenen Maus konnten Fontenot et al. dieses Problem umgehen. Er konnte FoxP3-positiven Zellen per FACS anreinigen und funktionell testen. Es zeigte sich, dass alle CD4⁺FoxP3⁺ Zellen funktionelle T_{reg} waren, jedoch exprimierten nicht alle dieser Zellen CD25 (Fontenot et al., 2005). Es musste also davon ausgegangen

werden, dass trotz der Gabe von PC61 noch immer T_{reg} im System vorhanden waren die die Immunisierung beeinflussen konnten.

Um abschätzen zu können, in welchem Maße die Gabe des PC61-Antikörpers die Menge der regulatorischen T-Zellen tatsächlich reduzierte, wurde auf die durchflusszytometrische Analyse des FoxP3-Moleküls zurückgegriffen. Wie in Abbildung 5.15 dargestellt, zeigte sich, dass in der Tat 14,8 % der $CD4^+FoxP3^+$ -Zellen CD25-negativ waren. Von den $CD8^+FoxP3^+$ -Zellen waren entsprechend etwa 70 % der Zellen CD25-negativ. Genaue Angaben ließen sich aufgrund der geringen Menge an $CD8^+FoxP3^+$ -Zellen nicht machen.

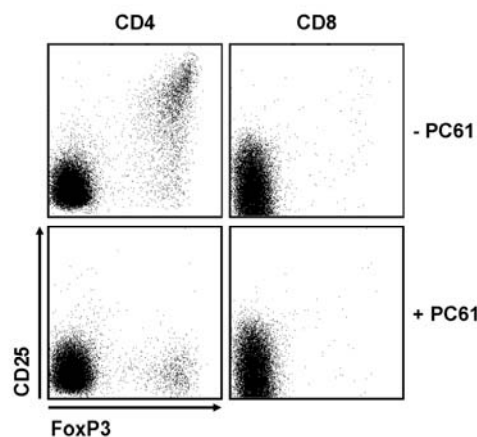


Abbildung 5.15: Die Applikation des PC61-Antikörpers führt nicht zur vollständigen Depletion regulatorischer T-Zellen in der Peripherie von B6-Mäusen.

500 μ g des PC61-Antikörpers wurden i.p. in B6-Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden Lymphozyten aus dem Blut dieser Mäuse, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten B6-Mäusen zur durchflusszytometrischen Analyse zunächst mit α -CD4-PE-Cy7-, α -CD8-APC-Cy7- und α -CD25-PE- (Klon: 7D4) Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde in Permeabilisierungspuffer mit einem APC-markierten Antikörper gegen FoxP3 gefärbt. Gezeigt sind die Signale für CD25 und FoxP3 auf $CD4^+$ - beziehungsweise $CD8^+$ -Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen.

Entsprechend hätte die Anzahl der $FoxP3^+$ -Zellen nach Gabe des PC61-Antikörpers also auf etwas weniger als ein Fünftel zurückgehen müssen. Es ließ sich jedoch klar erkennen (Abbildung 5.16), dass der Anteil der $FoxP3^+$ -Zellen nach Gabe des PC61-Antikörpers lediglich auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes zurückging, vielmehr schienen die $FoxP3^+$ -Zellen die CD25-Expression zu verlieren.

Betrachtete man die Anzahl der FoxP3-positiven Zellen genauer, so stellte man fest, dass in naiven Mäusen der Anteil der $FoxP3^+$ -Zellen bei 10,46 % ($CD4$) beziehungsweise 0,133 % ($CD8$) lag und durch die Applikation des PC61-Antikörpers um etwa 50 % auf 5,088 % beziehungsweise 0,088 % absank. Um eine eindeutigere

Aussage treffen zu können, wurde zur Färbung der Zellen zusätzlich ein Antikörper gegen GITR, einen weiteren Oberflächenmarker für T_{reg} , verwendet (McHugh et al., 2002). Es war zu erkennen, dass alle $FoxP3^+$ -Zellen auch GITR in hohen Mengen exprimierten.

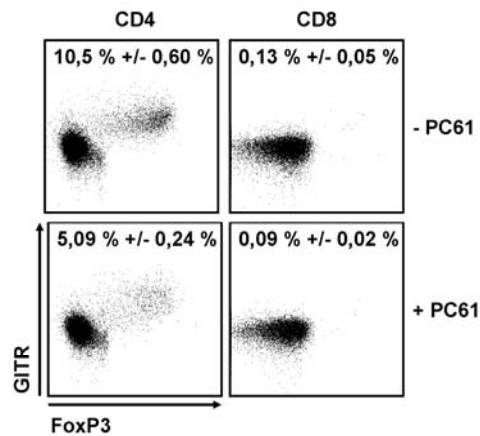


Abbildung 5.16: Die Applikation des PC61-Antikörpers führt zur Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen in der Peripherie von B6-Mäusen.

500 μ g des PC61-Antikörpers wurden i.p. in B6-Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden Lymphozyten aus dem Blut dieser Mäuse, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten B6-Mäusen zur durchflusszytometrischen Analyse zunächst mit α -CD4-PE-Cy7-, α -CD8-APC-Cy7- und α -GITR-FITC-Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde in Permeabilisierungspuffer mit einem APC-markierten Antikörper gegen FoxP3 gefärbt. Gezeigt sind die Signale für GITR und FoxP3 auf $CD4^+$ - beziehungsweise $CD8^+$ -Lymphozyten. Die Zahlen geben den Anteil der $GITR^+FoxP3^+$ -Zellen an allen $CD4^+$ - beziehungsweise $CD8^+$ -Lymphozyten, sowie die Standardabweichung aus 5 Werten an. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen aus einem von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit je 5 Mäusen pro Gruppe.

Es kann also festgehalten werden, dass sich die Zahl der T_{reg} mit dem PC61-Antikörper lediglich auf etwa die Hälfte der Größe der Ausgangspopulation reduzieren lässt. Ob die beobachtete Veränderung des Phänotyps mit einer Veränderung der Funktionalität einhergingen ließ sich allerdings nicht sagen.

5.3.3 $CD4^+$ - T_{reg} inhibierten die transkutane Immunisierung mit einem MHC I-Epitop

Anhand der vorher beschriebenen Beobachtungen ließ sich festhalten, dass $CD4^+$ - T_{reg} in der Peripherie der Tiere vorhanden waren und deren Zahl beziehungsweise deren Phänotyp durch die Gabe des PC61-Antikörpers verändert wurde. Aufgrund der niedrigen Anzahl ließ sich jedoch nicht sicher sagen, ob sich $CD8^+$ - T_{reg} in der Peripherie befanden und sich spezifisch durch die Gabe des PC61-Antikörpers

beeinflussen ließen, beziehungsweise war nicht klar ob es sich bei den wenigen FoxP3⁺CD25⁺GITR⁺CD8⁺-Zellen tatsächlich um T_{reg} handelte.

Bei näherer Betrachtung stellte sich die Frage, ob CD4-positive T-Zellen bei der transkutanen Immunisierung mit einem MHC I-Epitop überhaupt eine Rolle spielen könnten. Aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes sollte eine spezifische Erkennung des MHC I-bindenden Peptids durch CD4-positive T-Zellen höchst unwahrscheinlich sein. Die bisherigen Ergebnisse ließen also entweder eine Antigen-unspezifische Interaktion CD4-positiver T-Zellen oder eben eine Antigen-spezifische Interaktion CD8-positiver T-Zellen vermuten.

Um herauszuarbeiten welches dieser Szenarien als Erklärung für den beobachteten Effekt in Frage kam, wurde zunächst erneut auf ein *in vivo* Depletions-Modell zurückgegriffen. So wurden in den folgenden Experimenten vor der Immunisierung die CD4⁺-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper GK1.5 depletiert. Hierzu wurde der Antikörper zu je 100 µg fünf, drei und einen Tag vor der Immunisierung, sowie am zweiten Tag der Immunisierung i.p. appliziert, um die CD4⁺-Zellen möglichst vollständig aus dem System zu entfernen. Wie in Abbildung 5.17 zu sehen ist fanden sich am Tag der Immunisierung keine CD4⁺-Zellen in Peripherie. Eine durchflusszytometrische Analyse auf CD4, CD8 und TCRβ zeigte, dass alle TCRβ⁺-Zellen nach GK1.5-Gabe auch CD8-positiv waren, dass heißt es konnte hier ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung der CD4-Expression durch den Antikörper induziert wurde.

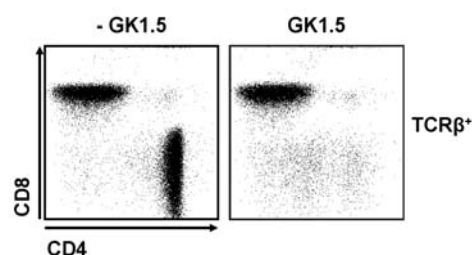


Abbildung 5.17: Die Applikation des GK1.5-Antikörpers führt zur annähernd vollständigen Depletion CD4⁺-T-Zellen in der Peripherie von B6-Mäusen.

Je 100 µg des GK1.5-Antikörpers wurden an den Tagen 0, 2 und 4 i.p. in B6-Mäuse injiziert. An Tag 5 wurden Lymphozyten aus dem Blut dieser Mäuse, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten B6-Mäusen zur durchflusszytometrischen Analyse mit α-CD4-PE-Cy7-, α-CD8-APC-Cy7- und α-TCRβ-PE-Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Signale für CD4 und CD8 auf TCRβ⁺PI-Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen.

Entsprechend wurde im nächsten Experiment einer Gruppe von Mäusen GK1.5-Antikörper nach obigem Schema injiziert und die Mäuse 2-mal mit je 100 µg

SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Zudem wurde eine Gruppe von Mäusen vor der Immunisierung mit PC61 behandelt. Als Kontrollen wurden Mäuse nur transkutan immunisiert beziehungsweise nur mit Aldara behandelt.

Wie in Abbildung 5.18 zu sehen ist resultierte die Applikation des α -CD25-Antikörpers wie zuvor beobachtet in einer deutlichen Verstärkung der durch die transkutane Immunisierung induzierten CTL-Antwort. So war bei einem Hintergrundsignal von 0,29 % DimerX⁺CD8⁺-Zellen in den Aldara behandelten Mäusen ein Anstieg auf 1,25 % in den immunisierten beziehungsweise auf 4,19 % in den immunisierten und PC61-behandelten Mäusen zu messen. Entsprechend war im Vergleich zu 0 % in den Aldara behandelten Mäusen nach 10 Stunden eine spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest von 18,1 % beziehungsweise 88,4 % zu beobachten. Betrachtete man dagegen die Antwort in den GK1.5-depletierten Mäusen, so ließ sich, ähnlich wie in den PC61-behandelten Mäusen, ein Anteil von 4,03 % DimerX-positiver Zellen sowie eine spezifische Lyse von 90,7 % nach 10 Stunden beobachten. Nicht gezeigt ist, dass bei transkutaner Immunisierung und gleichzeitiger Behandlung mit entsprechenden Mengen unspezifischer Antikörper desselben Isotyps kein Unterschied zu lediglich transkutan immunisierten Tieren zu beobachten war. Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die Applikation des GK1.5-Antikörpers, kombiniert mit der Gabe des Peptids in wirkstofffreier Creme, keine detektierbare Antwort hervorrief (nicht gezeigt).

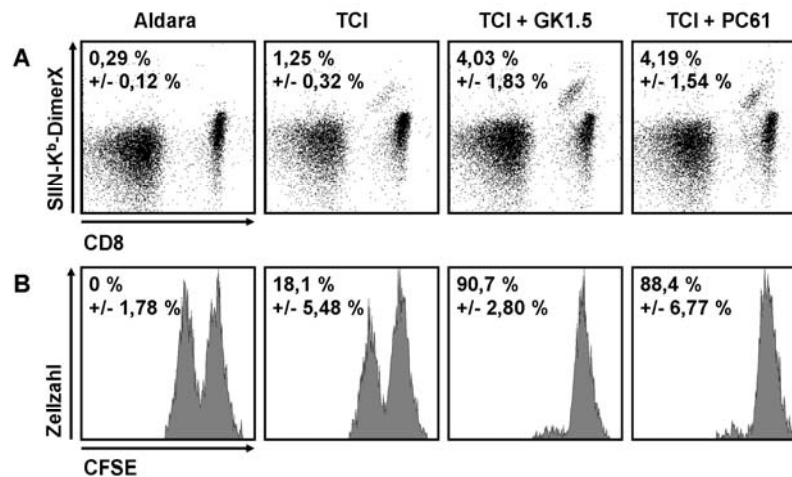


Abbildung 5.18: Die Applikation des GK1.5- und des PC61-Antikörpers vor der transkutanen Immunisierung führt zu einer ähnlichen verstärkten CTL-Antwort.

B6-Mäuse wurden innerhalb von 24 Stunden 2-mal mit 100 µg SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Neben Tieren die lediglich transkutan immunisiert wurden, wurde den Tieren aus einer weiteren Gruppe 5, 3 und einen Tag vor der Immunisierung, so wie mit der zweiten Immunisierung jeweils 100 µg GK1.5 i.p injiziert. Eine Gruppe erhielt 4 Tage vor der ersten Immunisierung 500 µg des PC61-Antikörpers i.p. Zudem wurde eine Gruppe von Tieren lediglich mit Aldara behandelt.

A) 7 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und zur durchflusszytometrischen Analyse mit α-CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten SIINFEKL-H2-K^b-DimerX gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und SIINFEKL-H2-K^b-DimerX der PI-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der SIINFEKL-H2-K^b-DimerX⁺ Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

B) 7 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard *in vivo* Zytotoxizitätstest überprüft. 10 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die jeweiligen CFSE-Signale der unterschiedlich behandelten Mäuse. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Man kann also festhalten, dass die Depletion der CD4-positiven Zellen einen ähnlichen Effekt hatte wie die Gabe des PC61-Antikörpers. Dies lässt also den Schluss zu, dass CD8⁺CD25⁺-T_{reg} keinen Einfluss auf die transkutane Immunisierung haben, beziehungsweise dass sich deren Funktion nicht durch den PC61-Antikörper beeinflussen lässt.

5.3.4 CD8⁺CD25⁺-Zellen inhibieren die Induktion einer CTL-Antwort durch die transkutane Immunisierung in A-α-Mäusen

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Menge der CD8⁺CD25⁺-T_{reg} so gering war, dass sich deren Effekt im durchgeführten Ansatz nicht nachweisen ließ. Aus diesem Grund wurde ein transgenes Mausmodell herangezogen. Bei den so genannten A-α-Mäusen handelt es sich um einen Knock-Out-Stamm bei dem die MHC II-Expression

gentechnisch unterbunden wurde (Kontgen et al., 1993). Es werden somit in diesen Mäusen keine CD4-positiven T-Zellen selektioniert, in der Peripherie der Tiere finden sich also nur CD8-positiv T-Zellen.

Die Analyse der CD8-positiven Zellen aus diesen Mäusen ließ, wie in Abbildung 5.19 dargestellt, erkennen, dass, entsprechend bereits publizierter Daten einer anderen Arbeitsgruppe (Bienvenu et al., 2005), im Vergleich zu B6-Mäusen ein deutlich höherer Anteil der Zellen FoxP3⁺GITR⁺ war. So waren in B6-Mäusen 0,133 % der CD8-positiven T-Zellen FoxP3- und GITR-doppelt-positiv. In den Knock-Out-Mäusen dagegen stieg dieser Wert auf 0,764 %. Dabei gilt zudem zu berücksichtigen, dass in den MHC II^{-/-}-Mäusen aufgrund des nicht besetzten CD4-Kompartiments etwa 3-mal mehr CD8-positiv T-Zellen zu finden waren (nicht gezeigt). Von den CD8⁺FoxP3⁺GITR⁺-Zellen waren etwa 50 % CD25-positiv, diese Zellpopulation sollte sich somit über die Gabe des PC61-Antikörpers beeinflussen lassen (siehe Abbildung 5.19) und bot so die Möglichkeit, den Beitrag dieser Zellen für die transkutane Immunisierung abzuschätzen.

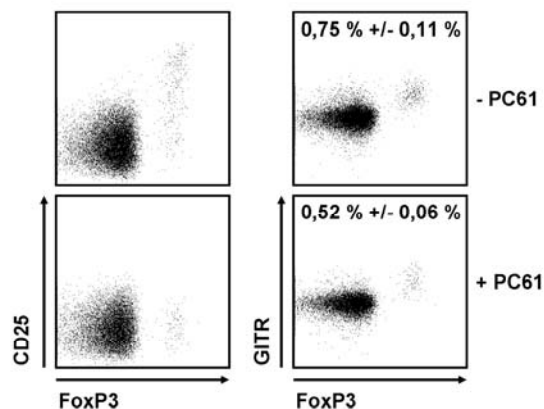


Abbildung 5.19: Die Applikation des PC61-Antikörpers erlaubt die Reduktion der Zahl CD8⁺FoxP3⁺GITR⁺-T-Zellen in der Peripherie von A- α -Mäusen.

500 μ g des PC61-Antikörpers wurden i.p. in A- α -Mäuse injiziert. 4 Tage nach der Injektion wurden Lymphozyten aus dem Blut dieser Mäuse, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten A- α -Mäusen durchflusszytometrisch analysiert. Die Lymphozyten wurden zunächst mit α -CD8-PerCP-, α -GITR-FITC- und α -CD25-PE- (Klon: 7D4) Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde in Permeabilisierungspuffer mit einem APC-markierten Antikörper gegen FoxP3 gefärbt. Gezeigt sind die Signale für CD25 gegen FoxP3 sowie GITR gegen FoxP3 auf CD8⁺-Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen. Die Zahlen geben den Anteil der FoxP3⁺GITR⁺-Zellen an der gesamten CD8⁺-Lymphozytenpopulation, sowie die Standardabweichung an. Die Werte und die Standardabweichung errechneten sich aus jeweils 5 Werten aus einem von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Bei der genauen Analyse der MHC II^{-/-}-Mäuse stellte sich heraus, dass trotz der fehlenden MHC II-Moleküle wenige CD4-positive T-Zellen in der Peripherie zu finden waren (Abbildung 5.20). Diese waren im Vergleich zu B6-Mäusen deutlich reduziert. In der Peripherie der B6-Mäuse fanden sich 17,7 % CD4⁺-Lymphozyten, in Peripherie der A- α -Mäuse dagegen lediglich 0,984 %.

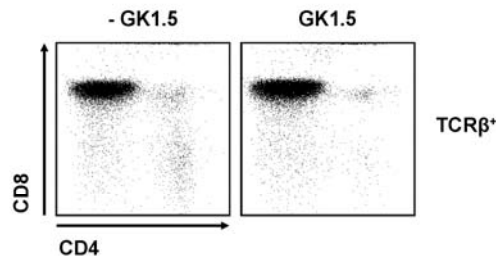


Abbildung 5.20: In der Peripherie der A- α -Mäuse findet sich ein geringer Anteil CD4⁺-Lymphozyten, diese ließen sich durch die Applikation des GK1.5-Antikörpers annähernd vollständig depletieren.

Je 100 μ g des GK1.5-Antikörpers wurden an den Tagen 0, 2 und 4 i.p. in A- α -Mäuse injiziert. An Tag 5 wurden Lymphozyten aus dem Blut dieser Mäuse, sowie Lymphozyten aus zuvor unbehandelten A- α -Mäusen zur durchflusszytometrischen Analyse mit α -CD4-PE-Cy7-, α -CD8-APC-Cy7- und α -TCR β -PE-Antikörpern gefärbt. Dargestellt sind die Signale für CD4 und CD8 auf TCR β ⁺PI⁻-Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen.

Betrachtete man diese Zellen genauer, so stellte sich heraus, dass, anders als in B6-Mäusen, 51,2 % statt nur 10,5 % einen FoxP3⁺GITR⁺-Phänotyp besaßen (Abbildung 5.21). Es ergab sich also erneut das Problem, dass CD4⁺-T_{reg} vorhanden waren. Hierbei galt es jedoch zu beachten, dass eine Interaktion dieser CD4⁺-Zellen mit anderen Zellen aufgrund der fehlenden MHC II-Moleküle prinzipiell nicht möglich war. Zudem war der Anteil der Zellen sehr gering. Eine Behandlung mit dem GK1.5-Antikörper gab zudem die Möglichkeit, die Zellen vollständig zu entfernen (Abbildung 5.20).

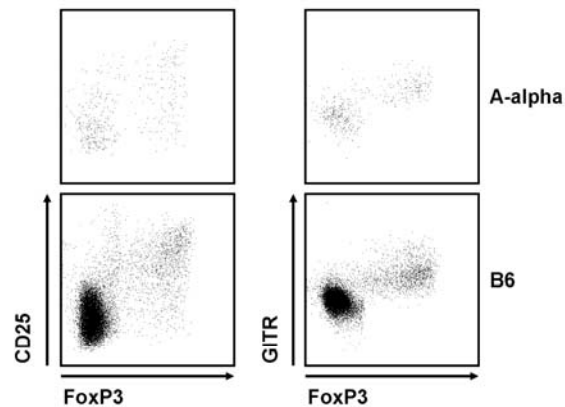


Abbildung 5.21: Die in der Peripherie der A- α -Mäuse vorhandenen CD4⁺-Lymphozyten sind zu einem großen Teil FoxP3⁺GITR⁺.

Blutlymphozyten aus A- α - und B6-Mäusen wurden zunächst mit α -CD4-PE-Cy7-, α -GITR-FITC- und α -CD25-PE- (Klon: 7D4) Antikörpern gefärbt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde in Permeabilisierungspuffer mit einem APC-markierten Antikörper gegen FoxP3 gefärbt. Gezeigt sind die Signale für CD25 gegen FoxP3 sowie GITR gegen FoxP3 auf CD8⁺-Lymphozyten. Abgebildet sind repräsentative Einzelmessungen.

Im Folgenden wurden nun MHC II^{-/-}-Mäuse mit beziehungsweise ohne vorherige Applikation des PC61-Antikörpers wie bereits oben beschrieben transkutan immunisiert. Außerdem wurde eine Gruppe von Tieren mit GK1.5 behandelt um die wenigen CD4-positiven T-Zellen restlos aus der Peripherie der Tiere zu entfernen. Als Negativkontrolle wurde eine Gruppe von Tieren nur mit Aldara behandelt. Die CTL-Antwort wurde 7 Tage nach der letzten Immunisierung dahingehend analysiert, dass der Anteil der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺-T-Zellen, sowie deren lytische Funktion getestet wurden. In Abbildung 5.22 ist zum einen zu erkennen, dass die transkutane Immunisierung in A- α -Mäusen eine größere DimerX-positive Population (2,62 %) induzierte als in B6 Mäusen (1,32 %, nicht gezeigt). Außerdem war eine effizientere Lyse im Zytotoxizitätstest innerhalb der ersten 10 Stunden zu beobachten. Die Lyse in A- α -Mäusen betrug 77,9 % im Vergleich zu 24,7 % in B6-Mäusen (nicht gezeigt). Außerdem war zu erkennen, dass die Injektion des GK1.5-Antikörpers keinen Effekt auf die Antwort in den A- α -Mäusen hatte. So waren 2,51 % DimerX-positive CD8⁺-T-Zellen zu detektieren, die spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest lag bei 82,4 %. Im Gegensatz dazu war zu erkennen, dass die Gabe des PC61-Antikörpers einen deutlichen Einfluss auf die induzierte Antwort hatte. Es war ein Anstieg in der Anzahl der DimerX-positiven CD8⁺-T-Zellen auf 3,82 % zu erkennen, entsprechend erhöhte sich auch die Funktionalität im Zytotoxizitätstest auf 95,5 %. Erneut hatten unspezifische Antikörper desselben Isotyps keinen Effekt auf die

Immunisierung (nicht gezeigt). Die Gabe der Antikörper in Kombination mit Peptid in wirkstofffreier Creme induzierte ebenfalls keine detektierbare Antwort (nicht gezeigt).

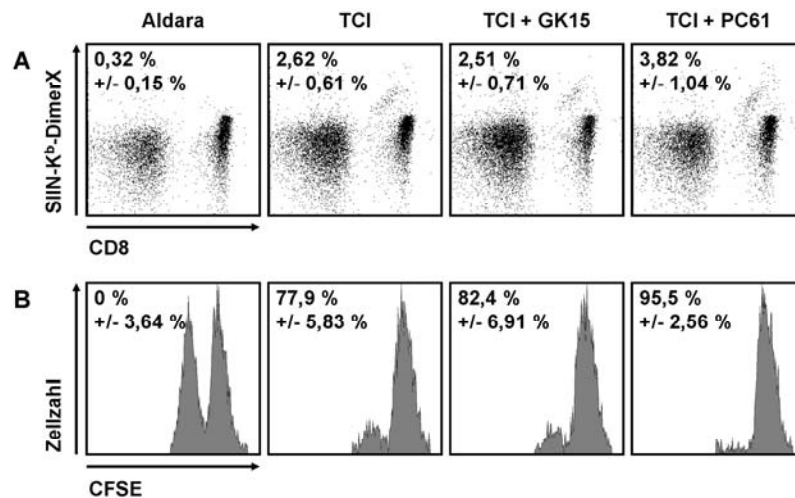


Abbildung 5.22: Die Applikation des PC61-Antikörpers vor der transkutanen Immunisierung führt zu einer verstärkten primären CTL-Antwort in A- α -Mäusen.

A- α -Mäuse wurden innerhalb von 24 Stunden 2-mal mit 100 μ g SIINFEKL und 50 mg Aldara immunisiert. Neben Tieren die lediglich transkutan immunisiert wurden, wurde den Tieren aus einer weiteren Gruppe 5, 3 und einen Tag vor der Immunisierung, so wie mit der zweiten Immunisierung jeweils 100 μ g GK1.5 i.p. injiziert. Eine Gruppe erhielt 4 Tage vor der ersten Immunisierung 500 μ g des PC61-Antikörpers i.p. Zudem wurde eine Gruppe von Tieren lediglich mit Aldara behandelt.

A) 7 Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut entnommen und zur durchflusszytometrischen Analyse mit α -CD8-APC-Cy7-Antikörper sowie einem PE-markierten SIINFEKL-H2-K^b-DimerX gefärbt. Es sind die Signale für CD8 und SIINFEKL-H2-K^b-DimerX der PI⁻-Lymphozyten gezeigt. Die Zahlen geben den Anteil der SIINFEKL-H2-K^b-DimerX⁺-Zellen an der gesamten CD8⁺-Population, sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

B) 7 Tage nach der Immunisierung wurde die Funktionalität der Antwort in einem Standard in vivo Zytotoxizitätstest überprüft. 10 Stunden nach der Injektion der Zielzellen wurden die Milzen der Tiere zur durchflusszytometrischen Analyse der CFSE-markierten Zielzellen entnommen. Dargestellt sind die jeweiligen CFSE-Signale der unterschiedlich behandelten Mäuse. Die Zahlen geben die durchschnittliche spezifische Lyse sowie die Standardabweichung aus 3 Werten an.

Die abgebildeten Einzelmessungen eines Experiments sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Diese Daten zeigen also, dass die CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺GITR⁺-T-Zellen in den A- α -Mäusen durch die Gabe des PC61-Antikörpers modifiziert wurden und daraus eine Verstärkung der durch die Immunisierung induzierten Antwort resultierte. Hieraus lässt sich also schließen, dass diese Zellen tatsächlich regulatorische Funktion besitzen, die in den B6-Mäusen vermutlich aufgrund der geringen Zahl der Zellen nicht zum Tragen kommt. Außerdem lässt sich feststellen, dass die vorhandenen CD4-Zellen keinen Einfluss auf die Antwort hatten, dies könnte zum einen daraus resultieren, dass durch die fehlenden MHC II-Moleküle keine Interaktion dieser Zellen stattfinden konnte, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Zellen nicht funktionell sind.

6. Diskussion – Transkutane Immunisierung

Nachdem Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen noch immer eine sehr große Bedrohung für die menschliche Gesundheit darstellen und in vielen Fällen sogar zum Tod führen können, steht die Bekämpfung dieser Krankheiten im Fokus der medizinischen Forschung. Neben therapeutischen Medikamenten sind bei Infektionskrankheiten (Rappuoli, 2004; Doherty et al., 2006) und gegebenenfalls bei Tumorerkrankungen (Rammensee, 2006; Srivastava, 2006; Lowy and Schiller, 2006), Impfmethode äußerst interessant. Nachdem sich die aktuellen Impfmethode nicht oder nur äußerst begrenzt auf andere Erreger oder Tumorerkrankungen anwenden lassen, sind neue, möglichst synthetische Impfansätze notwendig, die eine Adaption auf verschiedene Krankheiten erlauben.

Da viele Infektionskrankheiten vor allem in Entwicklungsländern extreme Probleme bereiten, sollten neue Impfstoffe billig herzustellen und einfach, am besten ohne ärztliche Aufsicht, anwendbar sein. Wegen der hohen Infektionsgefahr durch mehrfach verwendete Kanülen wäre ein Verzicht auf Injektionen zudem erstrebenswert.

Entsprechend dieser Vorgaben wurde hier ein voll synthetischer und einfach anzuwendender Impfstoff zur gezielten Aktivierung zytotoxischer T-Zellen entwickelt und getestet.

6.1 Die transkutane Immunisierung induziert eine systemische CTL-Antwort

Es konnte hier gezeigt werden, dass die gleichzeitige Applikation der Aldara-Creme mit dem darin enthaltenen TLR7-Liganden Imiquimod zusammen mit einem MHC I-bindenden Peptid zur Induktion einer spezifischen, gegen dieses Peptid gerichteten CTL-Antwort führt. So lässt sich im St42-Adoptiv-Transfer-Modell zeigen, dass eine auf den rasierten Rücken von Mäusen applizierte Mischung aus SGPSNTPPEI-Peptid und Aldara-Creme zur Aktivierung der transgenen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten führt. Die Effektorzellen verteilen sich nach einer etwa 48-stündigen Proliferationsphase in den Lymphknoten auf das gesamte System. Funktionelle Analysen zeigen, dass die Zellen voll aktiviert sind und neben lytischer Aktivität auch IFN- γ nach *ex vivo* Peptid-Restimulation produzieren.

Somit zeigte sich, dass dieser Ansatz prinzipiell funktioniert. Das Peptid wird nach einfachem Auftragen auf die Haut in die Lymphknoten transportiert und führt dort zur Aktivierung von T-Zellen. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass sich die Aldara-Creme als Adjuvans für T-Zell-Aktivierung eignet. Der Wirkstoff Imiquimod dringt in die Haut ein und führt zu einer Aktivierung der Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems die ihrerseits, beladen mit dem SGPSNTPPEI-Peptid, die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen vermitteln.

6.2 Die transkutane Immunisierung vermittelt Tumorprotektion

Die hier gezeigten, sowie die von Tobias Warger im Wild-Typ-Modell erhobenen Daten wurden in der Zwischenzeit durch eine sehr ähnliche Studie verifiziert (Itoh and Celis, 2005). In dieser Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die transkutane Immunisierung mit SIINFEKL in einem prophylaktischen Tumorexperiment mit OVA-transgenen Melanomzellen einen teilweise protektiven Effekt hat. So wachsen Tumore in zuvor immunisierten Tieren deutlich langsamer (Itoh and Celis, 2005), es kommt jedoch in allen Mäusen schließlich zum Auswachsen des Tumors. Dagegen konnte hier gezeigt werden, dass unter ähnlichen Bedingungen mit dem EG.7-Tumormodell eine vollständige Protektion der Tiere durch die transkutane Immunisierung erzielt wird. Dies könnte daran liegen, dass sich die induzierten Antworten aufgrund verschiedener Immunisierungsprotokolle in ihrer Effektivität unterscheiden. Viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass sich die beiden Tumormodelle in ihrer „Aggressivität“ unterscheiden. So ist davon auszugehen, dass die von Itoh verwendeten Melanomzellen (B16-Linie) deutlich schneller und effektiver anwachsen als die EG.7-Zellen. Entsprechend kann sich der Tumor schneller etablieren und wird weniger anfällig für die T-Zell-vermittelte Abwehr. Eine Modifikation des EG.7-Modells hin zu solchen Bedingungen kann auch hier gezeigt werden. Therapeutische Ansätze, das heißt Immunisierungen nach der Inokulation des Tumors erlauben die Effektivität der T-Zellen an etablierten Tumoren zu testen. Entsprechend kann hier nur eine teilweise Protektion der Mäuse beobachtet werden. So zeigt sich auch hier, dass die durch die transkutane Immunisierung induzierte T-Zell-Antwort bei etablierten Tumoren nur begrenzte Wirkung zeigt. Hier gilt es zu erwähnen, dass in therapeutischen Ansätzen selbst die transkutane Immunisierung in Kombination mit der Gabe des α -CD40-Antikörpers

keine volle Protektion vermitteln kann. Es ist also fraglich, inwiefern in diesem Modell etablierte Tumore überhaupt alleine durch CD8⁺-T-Zellen kontrolliert werden können.

6.3 Der Mechanismus der T-Zellaktivierung nach transkutaner Immunisierung ist ungeklärt

Die hier gezeigten Analysen, sowie die Studien von Itoh und Celis (Itoh and Celis, 2005), erlaubten keine eindeutigen Aussagen darüber, welche Zellen die Aktivierung der T-Zellen vermitteln. So ist nicht klar, ob Langerhanszellen aus der Epidermis oder Dendritische Zellen aus der Dermis nach Behandlung mit Aldara in die Lymphknoten wandern und dort das Priming der T-Zellen vermitteln. Hier würde ein von Adrien Kissenpfennig (Kissenpfennig et al., 2005) etabliertes Modell detailliertere Aussagen zulassen. Er generierte ein transgenes Mausmodell, bei dem die Langerhanszellen GFP exprimieren. So ließen sich nach der transkutanen Immunisierung die Langerhanszellen aus den drainierenden Lymphknoten per FACS isolieren und in einem *in vitro* Poliferationsassay mit TCR-transgenen T-Zellen als APCs einsetzen und mit den anderen im Lymphknoten gefundenen APCs vergleichen. Erste Experimente mit diesem Modell zeigten, dass nach der Applikation von Aldara sowohl aktivierte Langerhanszellen als auch aktivierte dermale DCs im Lymphknoten zu finden waren (nicht gezeigt). In diesem Modell exprimieren die Langerhanszellen zudem den humanen Rezeptor für Diphtheria Toxin, sie lassen sich also durch Gabe des Toxins depletieren. Entsprechend ließen sich also die Langerhanszellen vor der Immunisierung aus dem System entfernen und sich die resultierende Antwort analysieren.

Unabhängig davon bleibt die Frage offen, ob das Antigen tatsächlich von aus der Haut ausgewanderten Langerhanszellen beziehungsweise dermalen Dendritischen Zellen die durch Imiquimod aktiviert wurden in den Lymphknoten transportiert wird, oder ob das Peptid und eventuell auch der Wirkstoff eher über die Lymphe und den Blutkreislauf in die Lymphknoten gelangen. Die in Abbildung 5.7 gezeigten Daten lassen vermuten, dass es eventuell auch in der Milz zur Aktivierung einiger T-Zellen kommt. In anderen Modellen der transkutanen Immunisierung wurde bereits gezeigt, dass selbst in den mesenterialen Lymphknoten T-Zellen aktiviert wurden (Belyakov et al., 2004). Ob dabei jedoch das Peptid und das Adjuvans über das Blut beziehungsweise die Lymphe transportiert wurden, oder ob Zellen aus der Haut in die entsprechenden Lymphknoten einwandern, lässt sich nicht sagen.

Zeitlich höher aufgelöste Analysen mit CFSE-markierten Zellen in der Milz und verschiedenen Lymphknoten, sowie *in vitro* Poliferations-Experimente mit APCs aus den verschiedenen Lymphknoten und der Milz könnten genauere Aussagen über den Ort der Aktivierung der T-Zellen zulassen. Hierbei stellt sich vor allem das Problem, dass eventuell auch nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen, beziehungsweise nicht aktivierte Zellen das Peptid präsentieren und damit Anergie in den T-Zellen induzieren. Dieses Problem könnte jedoch umgangen werden, indem ein verlängertes Peptid zur Immunisierung verwendet werden würde, dieses könnte nur von aktivierten APCs prozessiert und präsentiert werden (van der Burg et al., 2006).

6.4 Exprimieren Langerhanszellen TLR7?

Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Applikation der Aldara-Creme in der Auswanderung von Langerhanszellen resultiert (Suzuki et al., 2000), diese Beobachtung lässt aber keine Aussage über den genauen Mechanismus zu. Kontroverse Berichte verschiedener Arbeitsgruppen lassen die Frage, ob Langerhanszellen den TLR7 exprimieren, offen (Thatcher et al., 2006; Burns, Jr. et al., 2000; Renn et al., 2006; Mitsui et al., 2004; Schiller et al., 2006). Dementsprechend könnte der Mechanismus der transkutanen Immunisierung komplexer sein als zunächst angenommen. Heib et al. konnten zeigen, dass die transkutane Immunisierung von dermalen Mastzellen, welche den TLR7 exprimieren (Matsushima et al., 2004), beeinflusst wird (Manuskript in Bearbeitung). Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass andere Zellen die transkutane Immunisierung ebenfalls beeinflussen.

Diese Annahme wird zudem von Beobachtungen in einem modifizierten Ansatz der transkutanen Immunisierung untermauert. So wurden mit dem Hintergrund, dass UV-B-Bestrahlung der Haut in einer Auswanderung der Langerhanszellen resultiert (Duthie et al., 2000), zuvor UV-B-bestrahlte Mäuse transkutan immunisiert. Es wurde eine durch die vermehrt auswandernden Langerhanszellen begünstigte und verstärkte Antwort angenommen. In der Tat konnte beobachtet werden, dass die Stärke der induzierten Antwort um ein vielfaches höher ist als in nicht bestrahlten Kontrollen (nicht gezeigt). Hier lässt sich ebenfalls ein Beitrag weiterer Zellen vermuten, die nach der UV-B-Bestrahlung in die oberen Hautschichten einwandern

und dort Zytokine sekretieren. Diese könnten mit dem Wirkstoff Imiquimod synergistische Wirkungen entfalten.

6.5 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen

Analysen anderer Gruppen zum Effekt der UV-B-Bestrahlung zeigten, dass die Gabe von Antigen über zuvor über einen längeren Zeitraum hinweg bestrahlte Haut zur Induktion von Toleranz führen kann. So konnte gezeigt werden, dass viermalige UV-B-Bestrahlung und anschließende Gabe von Protein, sogar in Verbindung mit einem Adjuvans, in der Induktion einer Population regulatorischer T-Zellen resultiert (Ghoreishi and Dutz, 2006). Die Haut scheint also für die Modulation adaptiver Immunantworten besonders geeignet zu sein. Es stellte sich also die Frage, ob T_{reg} die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort beeinflussen. So wurden die T_{reg} , wie zuvor beschrieben (Suvas et al., 2003; Turk et al., 2004) durch die Injektion des PC61-Antikörpers (α -CD25) depletiert. Genauere Analysen zeigen jedoch, dass die Injektion des Antikörpers die T_{reg} eher reduzierte, jedoch nicht vollständig depletiert. Entsprechende Beobachtungen wurden in der Zwischenzeit von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert. Kohm et al. konnten zeigen, dass die Injektion des PC61-Antikörpers zu einer Reduktion der CD25-Expression auf der Oberfläche der FoxP3⁺-Zellen führt, sich die absolute Zahl der FoxP3⁺-Zellen aber nicht verändert. Weitere Tests hingegen zeigen, dass die Zellen nicht mehr funktionell sind und die Injektion des PC61-Antikörpers zum Ausbruch von Autoimmunkrankheiten führen kann (Kohm et al., 2006). Mit der Injektion des Antikörpers lässt sich also dennoch der erhoffte Effekt, nämlich die Inaktivierung der T_{reg} , erzielen.

Mit Hilfe des PC61-Antikörpers konnte hier schließlich gezeigt werden, dass CD25⁺- T_{reg} in der Tat die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort inhibieren. Offensichtlich ergibt sich hieraus jedoch das Problem, dass die Immunisierung auf ein CD8-Epitop begrenzt war und die direkte spezifische Erkennung des Antigens durch CD4⁺CD25⁺-Zellen, welche die Hauptpopulation der beschriebenen T_{reg} sind (Shevach, 2006), ausgeschlossen werden kann. Es gibt also zum einen die Möglichkeit, dass entweder CD4⁺CD25⁺-Zellen eine unspezifische Hemmung vermitteln, oder aber dass CD8⁺CD25⁺-Zellen mit regulatorischer Funktion die Antwort spezifisch unterdrücken. Hierbei gilt es zu erwähnen, dass natürlich vorkommende CD25⁺CD8⁺- T_{reg} in Mäusen bisher lediglich einmal beschrieben

wurden (Bienvenu et al., 2005). Daneben sind natürlich vorkommende $CD8^+CD122^-T_{reg}$ (Rifa'i et al., 2004), sowie eine Reihe induzierter $CD8^+T_{reg}$ (Hoglund, 2006; Shevach, 2006) bekannt. Um also die Frage nach dem Einfluss der $CD4^+CD25^-$ - und $CD8^+CD25^-T_{reg}$ zu beantworten blieb zunächst lediglich die Möglichkeit, die $CD4^+$ -Zellen vor der Immunisierung aus dem System zu entfernen und die resultierende Antwort mit der Antwort nach PC61-Injektion zu vergleichen. Hier wird in beiden Fällen eine vergleichbare Antwort gemessen. Es wurde also deutlich, dass in der Tat $CD4^+CD25^-$ -Zellen die Aktivierung der CTLs in einer unspezifischen Art und Weise unterdrücken. Der genaue Mechanismus dieser Suppression lässt sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht aufklären. Es ist jedoch denkbar, dass T_{reg} nicht vollständig aktivierte DCs in ihrer Funktion inhibieren und somit eine allgemeine Dämpfung von Immunantworten verursachen. Im gegebenen Fall könnten also, nach vorheriger Inaktivierung der T_{reg} , auch nicht vollständig aktivierte APCs T-Zellen aktivieren, was in einer stärkeren CTL-Antwort resultieren würde. Diese Annahme wird von der Beobachtung gestützt, dass DCs, die einen besonders aktivierten Phänotyp aufweisen, in *in vitro* Experimenten, in der Lage sind, die durch T_{reg} vermittelte Suppression zu brechen (Pasare and Medzhitov, 2003; Warger et al., 2006). Entsprechend würde bei Autoimmun- und Tumormodellen die Injektion des Antikörpers dazu führen, dass schwach aktivierte APCs eigen- beziehungsweise Tumorantigen-spezifische T-Zellen aktivieren können, ohne dass dazu ein Adjuvans notwendig ist (Ko et al., 2005; Turk et al., 2004). Dies würde also umgekehrt die Möglichkeit eröffnen, die T_{reg} vermittelte Suppression dadurch zu minimieren, dass der Impfmischung zusätzliche Adjuvanzen beigemischt würden, die eine vollständige Aktivierung der APCs erlauben.

Bezüglich des Beitrages $CD8^+T_{reg}$ warfen die in der Peripherie der naiven Mäuse detektierbaren $CD8^+CD25^+FoxP3^+GITR^+$ -Zellen die Frage auf, ob diese Zellen ebenfalls regulatorische Funktion besitzen und ob sie ebenfalls Einfluss auf die transkutane Immunisierung nehmen. Da deren Zahl in Wild-Typ-Mäusen sehr gering ist, musste damit gerechnet werden, dass ihr Beitrag unter den bisherigen Bedingungen nicht detektierbar ist. Es wurde daher auf ein bereits beschriebenes Modell zurückgegriffen. In einem MHC II^{-/-}-Mausmodell können Effekte der $CD4^+$ -positiven Zellen zum einen ausgeschlossen werden, zum anderen konnte gezeigt werden, dass dort eine, im Vergleich zum Wild-Typ ausgeprägtere, $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ -Population auftritt, die in der Tat regulatorische Funktionen

aufweist (Bienvenu et al., 2005). Die entsprechenden Experimente wurden also in MHC II^{-/-}-Mäusen (A- α -Stamm) wiederholt. Hier zeigte sich, wie zuvor, ein ähnlicher Effekt der PC61-Injektion. Die CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen supprimieren also ebenfalls die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort. Hierbei ist zu erwähnen, dass in der Peripherie der A- α -Mäuse ebenfalls CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺GITR⁺-Zellen zu finden waren. Diese hatten jedoch keinen Einfluss auf die Immunisierung und wurden bereits als nicht funktionell beschrieben (Bienvenu et al., 2005).

Es zeigt sich also deutlich, dass sowohl CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺GITR⁺- als auch CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺GITR⁺-Zellen die durch die transkutane Immunisierung induzierte CTL-Antwort hemmen. Es lässt sich jedoch nicht klären, wie groß der Einfluss der jeweiligen Population dabei ist. Vor allem bezüglich der CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺GITR⁺-Zellen lässt sich nicht sagen, ob diese Effekte in Wild-Typ-Mäusen tatsächlich auftreten und welchen Effekt sie haben.

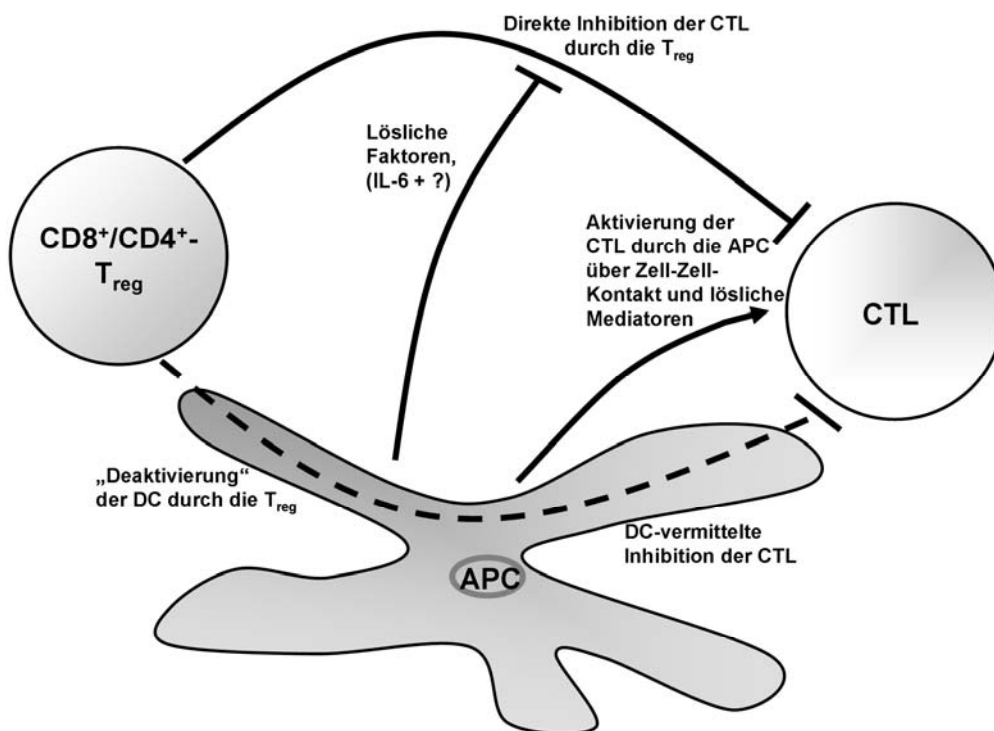


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Inhibition der CTL-Aktivierung durch T_{reg}

Die Inhibition der CTL-Aktivierung durch T_{reg} kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen, die direkte Beeinflussung der CTL durch die T_{reg}, oder die Beeinflussung der APC durch die T_{reg}, die schließlich in einer reduzierten Aktivierung der CTL resultiert. Dabei ist lediglich bekannt, dass die Suppression durch die T_{reg} kontaktabhängig ist und die Suppression der T_{reg} von stark aktivierten DCs durch die Ausschüttung an IL-6 und weiteren löslichen Faktoren aufgehoben werden kann.

6.6 Die transkutane Immunisierung induziert keine Gedächtnisantwort

Betrachtet man die protektive Kapazität der durch die transkutane Immunisierung induzierten CTL-Antwort im prophylaktischen Ansatz bei einer Inokulation, die mehrere Wochen nach der Immunisierung stattfand (Abbildung 3.11 B), so wird eines der Hauptprobleme der hier beschriebenen transkutanen Immunisierung deutlich: Die fehlende Induktion einer stabilen Gedächtnispopulation. So gewährt die hier etablierte Impfmethode keinen langfristigen Schutz. Entsprechend konnte Tobias Warger zeigen, dass die CTL-Antwort im Wild-Typ ihr Maximum nach 7 bis 8 Tagen erreicht, danach aber sehr schnell kontrahiert und nach etwa 14 Tagen nur noch knapp über dem Hintergrund liegt. Er konnte zudem zeigen, dass die Applikation des monoklonalen α -CD40-Antikörpers FKG-45 in Kombination mit der transkutanen Immunisierung in einer stabilen Gedächtnisantwort resultiert (Warger 2006, Manuskript im Druck). Der Wirkmechanismus des CD40-Antikörpers ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wird aber angenommen, dass er die CD40-CD40L-Interaktion zwischen APC und CD4-Zellen und somit eine CD4-Helferantwort mimikriert (Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Es könnte also zu einer zusätzlichen Aktivierung der APCs kommen, die die Induktion einer Gedächtnisantwort erlaubt. Eine parallele Applikation von α -CD40-Antikörpern ist wegen der nicht gänzlich aufgeklärten Wirkung therapeutisch nicht denkbar und aufgrund der notwendigen Injektion nicht sinnvoll mit der transkutanen Immunisierung kombinierbar. Es können jedoch zwei Schlüsse aus diesen Beobachtungen gezogen werden: Zum einen könnte die Aktivierung von CD4-Zellen im Rahmen der transkutanen Immunisierung in einer Gedächtnisantwort resultieren, zum anderen könnte einer stärkere Aktivierung der APCs die Induktion einer Gedächtnisantwort erlauben.

Es gilt zunächst zu bemerken, dass in vielen Systemen gezeigt werden konnte, dass CD4-Helfer essentiell für die Bildung einer stabilen CTL-Gedächtnisantwort sind (Rocha and Tanchot, 2004; Behrens et al., 2004). Es liegt daher nahe, die zusätzliche Aktivierung CD4⁺-T-Zellen anzustreben. Dazu wurde ein Peptid, das sowohl eine Sequenz für ein CD4-Epitop sowie das SIINFEKL-Peptid enthielt, zur Immunisierung verwendet. Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Immunisierung funktioniert, eine Gedächtnisantwort allerdings nicht generiert wird. Auch eine vorherige Aktivierung der CD4-Zellen zeigt keinen Effekt (nicht gezeigt). Hier

müssten also weitere Analysen folgen, die schließlich die parallele Aktivierung von CD4-Helferzellen ermöglichen. Ein Ansatzpunkt wäre die Immunisierung mit ganzem Protein. Hier gilt es jedoch zunächst zu klären, ob das Protein in die Haut diffundieren und von den APCs prozessiert und präsentiert werden kann, um die Aktivierung der T-Zellen zu gewährleisten. Dazu sind umfangreiche Analysen notwendig. Über die Verwendung des richtigen Lösungsmittels bis hin zur Frage nach der Immunisierung vorausgehenden Behandlungen der Haut zur Zerstörung beziehungsweise Modifikation des Stratum Corneum (Belyakov et al., 2004).

Neben der Aktivierung von CD4⁺-Zellen wäre, wie bereits erwähnt, eine stärkere Aktivierung der APCs denkbar. Die Aktivierung sollte dabei einen Grad erreichen, der durch die Aktivierung über die CD40-CD40L-Interaktion erreicht wird. Um dieses Ziel zu erreichen, eignen sich am besten TLR-Liganden oder andere, bevorzugt synthetisch herstellbare, PAMPs. Es konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Aktivierung von BMDCs mit 2 verschiedenen TLR-Liganden in einer besonders starken Aktivierung der Zellen resultierte (Gautier et al., 2005; Napolitani et al., 2005; Warger et al., 2006). Es bleibt also zu ergründen, ob derartig aktivierte Zellen auch ohne CD4-Hilfe eine CTL-Gedächtnisantwort induzieren können, beziehungsweise ob andere Kombinationen mehrerer aktivierender Agenzien einen Aktivierungsgrad antigenpräsentierender Zellen hervorrufen können, der der Aktivierung durch CD4-Zellen entspricht.

Es lässt sich also zusammenfassend feststellen, dass die hier entwickelte transkutane Immunisierungsmethode die effektive Aktivierung zytotoxischer T-Zellen erlaubt. Die Methode ist einfach und ohne ärztliche Aufsicht anwendbar. Die bloße Applikation des Impfstoffes auf die Haut eliminiert die Infektionsgefahr über mehrfach verwendete Kanülen. Der Impfstoff enthält lediglich vollsynthetische Komponenten, die kostengünstig herzustellen sind und eine relativ einfache Zulassung eines möglichen Medikaments in Aussicht stellen. Um einen zuverlässigen, langfristigen Impfschutz durch die transkutane Immunisierung zu gewährleisten, müsste jedoch zunächst die Frage der ausbleibenden Gedächtnisantwort geklärt werden. Hier stellen Modifikationen des Antigens, die Addition weiterer aktivierender Agenzien sowie die Vorbehandlung der Haut mit UV-B-Strahlung die naheliegendsten und vielversprechendsten Optionen dar.

Nicht zuletzt wird sich in Untersuchungen am Menschen zeigen müssen, ob sich die im Mausmodell gemachten Beobachtungen überhaupt auf den Menschen übertragen

lassen. Bereits zuvor ins menschliche System übertragene transkutane Immunisierungs-Methoden (Mitragotri, 2005) sowie die Tatsache, dass es sich bei der Aldara-Creme um ein zugelassenes Medikament handelt, lassen hoffen, dass dies der Fall sein wird.

7. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die CD8⁺-T-Zellen der beiden Mausstämme St42 und St35 die denselben transgenen SGPSNTPPEI·H2-D^b-spezifischen TCR exprimieren im Detail charakterisiert. Die Expression des Rezeptors liegt dabei auf St42-T-Zellen um den Faktor 2 bis 3 höher als auf den St35-T-Zellen. Die Menge des exprimierten TCR reicht in beiden Fällen zur effektiven Selektion der T-Zellen im Thymus aus. Phänotypische Analysen der Zellen ergaben, abgesehen von der Menge des TCR, keine Unterschiede zwischen den Zellen. Es konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass sich der TCR-Dichteunterschied bei der Aktivierung der T-Zellen *in vitro* weder auf die Aktivierung der Zellen, noch auf deren Funktionalität auswirkt. Werden die Zellen dagegen nach adoptivem Transfer *in vivo* aktiviert, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Expansion der Effektorzellen. So bedingt die reduzierte Avidität der St35-T-Zellen eine, im Vergleich zu den St42-T-Zellen deutlich geringere Expansion nach Immunisierung mit Peptid-beladenen BMDCs. Nichtsdestotrotz sind St42- und St35-Effektorzellen voll funktionell und weisen einen vollständig aktivierten Phänotyp auf. In beiden Fällen hängt die Expansion der Zellen von der Menge der zur Immunisierung verwendeten DCs ab, die Titration der Peptidkonzentration auf den DCs hat dagegen keinen Einfluss auf die induzierte Antwort.

Werden beide T-Zellklone in einem 1:1-Verhältnis adoptiv transferiert und durch Peptid-beladene BMDCs aktiviert, so expandiert nur die St42-Population in einem zum Einzeltransfer vergleichbaren Maß. Beobachtet man dagegen die Expansion der St35-T-Zellen, so tritt in Gegenwart der St42-T-Zellen eine um den Faktor 3 kleinere Effektorpopulation auf. Die beiden T-Zellklone konkurrieren also um APCs, wobei die hochaviden St42-T-Zellen den niederaviden St35-Zellen überlegen sind und deren Aktivierung behindern. Erfolgt vor der Immunisierung ein Kotransfer beider Klone mit einem mindestens 10-fachem Überschuss an niederaviden T-Zellen, so ist im Vergleich zum Einzeltransfer eine reduzierte Expansion der hochaviden St42-T-Zellen zu beobachten, während die Expansion der niederaviden Zellen nicht eingeschränkt ist. Es kann also beobachtet werden, dass die Konkurrenz der T-Zellen eine Funktion der Avidität und der Vorläuferfrequenz der T-Zellen ist.

In allen Fällen sind sämtliche auftretende Effektor-T-Zellen voll funktionell, unabhängig davon, ob die Zellen in der Konkurrenz über- oder unterlegen waren.

Die Menge der zur Immunisierung verwendeten DCs hat ebenso wenig Einfluss auf den Ausgang der Competition wie die Menge des auf die DCs geladenen Peptids.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine neue, nicht-invasive Immunisierungs-Methode zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen im Mausmodell etabliert. Die Methode beruht auf der Applikation einer TLR7-Liganden-enthaltenden Creme zusammen mit einem MHC I-Peptid. Es konnte gezeigt werden, dass nach adoptivem Transfer von St42-T-Zellen das Auftragen der Aldara-Creme zusammen mit dem SGP-Peptid auf den rasierten Rücken der Mäuse zur Induktion einer systemischen und voll funktionellen CTL-Antwort führt. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine derartige Immunisierung von Wild-Typ-Mäusen mit dem SIINFEKL-Peptid eine Tumorprotektive Antwort induziert. In prophylaktischen Ansätzen kann eine vollständige Protektion erreicht werden, während in therapeutischen Ansätzen lediglich eine teilweise Protektion beobachtet werden kann.

Darüber hinaus konnte durch Depletion CD25- beziehungsweise CD4-positiver Zellen vor der Immunisierung gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen die Aktivierung der CTLs nach transkutaner Immunisierung inhibieren. Die Depletion der Zellen führt zu einer deutlich stärkeren CTL-Antwort sowie zur Induktion einer bis zu 35 Tage nach der Immunisierung nachweisbaren Gedächtnisantwort.

In einem MHC II-Knock-Out-Modell konnte durch Depletion CD25-positiver Zellen gezeigt werden, dass dort CD8⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen auftreten, die die Induktion einer CTL-Antwort durch die transkutane Immunisierung negativ beeinflussen.

8. Literaturverzeichnis

Agace,W.W. (2006). Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 682-692.

Ahmadzadeh,M., Hussain,S.F., and Farber,D.L. (2001). Heterogeneity of the memory CD4 T cell response: persisting effectors and resting memory T cells. *J. Immunol.* 166, 926-935.

Aichele,P., Brduscha-Riem,K., Oehen,S., Odermatt,B., Zinkernagel,R.M., Hengartner,H., and Pircher,H. (1997). Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity.* 6, 519-529.

Alexander-Miller,M.A. (2005). High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol. Res.* 31, 13-24.

Alfonso,C. and Karlsson,L. (2000). Nonclassical MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 113-142.

Alimonti,J.B., Shi,L., Baijal,P.K., and Greenberg,A.H. (2001). Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 276, 6974-6982.

Allan,R.S., Waithman,J., Bedoui,S., Jones,C.M., Villadangos,J.A., Zhan,Y., Lew,A.M., Shortman,K., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity.* 25, 153-162.

Alymova,I.V., Taylor,G., and Portner,A. (2005). Neuraminidase inhibitors as antiviral agents. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 5, 401-409.

Anderson,M.S., Venanzi,E.S., Chen,Z., Berzins,S.P., Benoist,C., and Mathis,D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 23, 227-239.

Andreasen,S.O., Christensen,J.E., Marker,O., and Thomsen,A.R. (2000). Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J. Immunol.* *164*, 3689-3697.

Asseman,C., Mauze,S., Leach,M.W., Coffman,R.L., and Powrie,F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *190*, 995-1004.

Auphan-Anezin,N. and Schmitt-Verhulst,A.M. (2001). Differential survival of transferred CD8 T cells and host reconstitution depending on TCR avidity for host-expressed alloantigen. *J. Immunol.* *166*, 7200-7207.

Auphan-Anezin,N., Verdeil,G., and Schmitt-Verhulst,A.M. (2003). Distinct thresholds for CD8 T cell activation lead to functional heterogeneity: CD8 T cell priming can occur independently of cell division. *J. Immunol.* *170*, 2442-2448.

Azzam,H.S., DeJarnette,J.B., Huang,K., Emmons,R., Park,C.S., Sommers,C.L., El Khoury,D., Shores,E.W., and Love,P.E. (2001). Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J. Immunol.* *166*, 5464-5472.

Azzam,H.S., Grinberg,A., Lui,K., Shen,H., Shores,E.W., and Love,P.E. (1998). CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* *188*, 2301-2311.

Baars,P.A., Sierro,S., Arens,R., Tesselaar,K., Hooibrink,B., Klenerman,P., and van Lier,R.A. (2005). Properties of murine (CD8+). *Eur. J. Immunol.* *35*, 3131-3141.

Bachmann,M.F., Kundig,T.M., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (1997). Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 640-645.

Bachmann,M.F., Wolint,P., Schwarz,K., Jager,P., and Oxenius,A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J. Immunol.* *175*, 4686-4696.

Banchereau,J., Bazan,F., Blanchard,D., Briere,F., Galizzi,J.P., Van Kooten,C., Liu,Y.J., Rousset,F., and Saeland,S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 881-922.

Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., and Palucka,K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 767-811.

Baron,V., Bouneaud,C., Cumano,A., Lim,A., Arstila,T.P., Kourilsky,P., Ferradini,L., and Pannetier,C. (2003). The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity.* *18*, 193-204.

Barry,M., Heibein,J.A., Pinkoski,M.J., Lee,S.F., Moyer,R.W., Green,D.R., and Bleackley,R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell Biol.* *20*, 3781-3794.

Becker,T.C., Wherry,E.J., Boone,D., Murali-Krishna,K., Antia,R., Ma,A., and Ahmed,R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J. Exp. Med.* *195*, 1541-1548.

Behrens,G., Li,M., Smith,C.M., Belz,G.T., Mintern,J., Carbone,F.R., and Heath,W.R. (2004). Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol. Cell Biol.* *82*, 84-90.

Belyakov,I.M., Hammond,S.A., Ahlers,J.D., Glenn,G.M., and Berzofsky,J.A. (2004). Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J. Clin. Invest* *113*, 998-1007.

Bennett,S.R., Carbone,F.R., Karamalis,F., Flavell,R.A., Miller,J.F., and Heath,W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* *393*, 478-480.

Benvenuti,F., Lagaudriere-Gesbert,C., Grandjean,I., Jancic,C., Hivroz,C., Trautmann,A., Lantz,O., and Amigorena,S. (2004). Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* *172*, 292-301.

Berg,E.L., Robinson,M.K., Warnock,R.A., and Butcher,E.C. (1991). The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J. Cell Biol.* *114*, 343-349.

Bettelli,E., Carrier,Y., Gao,W., Korn,T., Strom,T.B., Oukka,M., Weiner,H.L., and Kuchroo,V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.

Bevan,M.J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* *143*, 1283-1288.

Bevan,M.J. (2006). Cross-priming. *Nat. Immunol.* *7*, 363-365.

Biava,M., Porretta,G.C., Deidda,D., and Pompei,R. (2006). New trends in development of antimycobacterial compounds. *Infect. Disord. Drug Targets.* *6*, 159-172.

Bienvenu,B., Martin,B., Auffray,C., Cordier,C., Becourt,C., and Lucas,B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol.* *175*, 246-253.

Blattman,J.N., Antia,R., Sourdive,D.J., Wang,X., Kaech,S.M., Murali-Krishna,K., Altman,J.D., and Ahmed,R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* *195*, 657-664.

Blattman,J.N., Sourdive,D.J., Murali-Krishna,K., Ahmed,R., and Altman,J.D. (2000). Evolution of the T cell repertoire during primary, memory, and recall responses to viral infection. *J. Immunol.* *165*, 6081-6090.

Boes,B., Hengel,H., Ruppert,T., Multhaup,G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* *179*, 901-909.

Bonomo,R.A. and Szabo,D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* *43 Suppl 2*, S49-S56.

Borrow,P., Tishon,A., Lee,S., Xu,J., Grewal,I.S., Oldstone,M.B., and Flavell,R.A. (1996). CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8⁺ CTL response. *J. Exp. Med.* *183*, 2129-2142.

Bouneaud,C., Garcia,Z., Kourilsky,P., and Pannetier,C. (2005). Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *201*, 579-590.

Bourgeois,C., Rocha,B., and Tanchot,C. (2002). A role for CD40 expression on CD8⁺ T cells in the generation of CD8⁺ T cell memory. *Science* *297*, 2060-2063.

Boursalian,T.E. and Bottomly,K. (1999). Survival of naive CD4 T cells: roles of restricting versus selecting MHC class II and cytokine milieu. *J. Immunol.* *162*, 3795-3801.

Bousso,P. and Robey,E. (2003). Dynamics of CD8⁺ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat. Immunol.* *4*, 579-585.

Bradley,L.M., Dalton,D.K., and Croft,M. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol.* *157*, 1350-1358.

Braud,V.M., Allan,D.S., and McMichael,A.J. (1999). Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 100-108.

Brocker,T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* *186*, 1223-1232.

Browne,K.A., Blink,E., Sutton,V.R., Froelich,C.J., Jans,D.A., and Trapani,J.A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol. Cell Biol.* *19*, 8604-8615.

Burns,R.P., Jr., Ferbel,B., Tomai,M., Miller,R., and Gaspari,A.A. (2000). The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans' cells. *Clin. Immunol.* *94*, 13-23.

Busch,D.H. and Pamer,E.G. (1999). T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J. Exp. Med.* *189*, 701-710.

Cannons,J.L. and Schwartzberg,P.L. (2004). Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases? *Curr. Opin. Immunol.* 16, 296-303.

Cayeux,S., Richter,G., Noffz,G., Dorken,B., and Blankenstein,T. (1997). Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation. *J. Immunol.* 158, 2834-2841.

Chao,C.C., Jensen,R., and Dailey,M.O. (1997). Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J. Immunol.* 159, 1686-1694.

Chapman,H.A. (2006). Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 78-84.

Chen,W., Anton,L.C., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (2000). Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity.* 12, 83-93.

Chen,Y., Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., and Weiner,H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237-1240.

Cho,B.K., Wang,C., Sugawa,S., Eisen,H.N., and Chen,J. (1999). Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 2976-2981.

Cole,D.K. and Gao,G.F. (2004). CD8: adhesion molecule, co-receptor and immunomodulator. *Cell Mol. Immunol.* 1, 81-88.

Coors,E.A., Schuler,G., and Von Den,D.P. (2006). Topical imiquimod as treatment for different kinds of cutaneous lymphoma. *Eur. J. Dermatol.* 16, 391-393.

Creagh,E.M. and O'Neill,L.A. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 352-357.

Croft,M. and Swain,S.L. (1991). B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4, and IL-6. *J. Immunol.* 146, 4055-4064.

Darmon,A.J., Nicholson,D.W., and Bleackley,R.C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-448.

Davis,M.M. and Bjorkman,P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395-402.

de Bree,G.J., van Leeuwen,E.M., Out,T.A., Jansen,H.M., Jonkers,R.E., and van Lier,R.A. (2005). Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. *J. Exp. Med.* 202, 1433-1442.

Deeks,S.G. (2006). Antiretroviral treatment of HIV infected adults. *BMJ* 332, 1489.

Deng,Y., Yewdell,J.W., Eisenlohr,L.C., and Bennink,J.R. (1997). MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J. Immunol.* 158, 1507-1515.

Derbinski,J., Gabler,J., Brors,B., Tierling,S., Jonnakuty,S., Hergenhausen,M., Peltonen,L., Walter,J., and Kyewski,B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33-45.

Doherty,P.C., Turner,S.J., Webby,R.G., and Thomas,P.G. (2006). Influenza and the challenge for immunology. *Nat. Immunol.* 7, 449-455.

Duan,H., Orth,K., Chinnaiyan,A.M., Poirier,G.G., Froelich,C.J., He,W.W., and Dixit,V.M. (1996). ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 271, 16720-16724.

Dudda,J.C., Lembo,A., Bachtanian,E., Huehn,J., Siewert,C., Hamann,A., Kremmer,E., Forster,R., and Martin,S.F. (2005). Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 35, 1056-1065.

Dudda,J.C. and Martin,S.F. (2004). Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments. *Trends Immunol.* 25, 417-421.

- Duke,R.C., Persechini,P.M., Chang,S., Liu,C.C., Cohen,J.J., and Young,J.D. (1989). Purified perforin induces target cell lysis but not DNA fragmentation. *J. Exp. Med.* 170, 1451-1456.
- Duthie,M.S., Kimber,I., Dearman,R.J., and Norval,M. (2000). Differential effects of UVA1 and UVB radiation on Langerhans cell migration in mice. *J. Photochem. Photobiol. B* 57, 123-131.
- Eddahri,F., Oldenhove,G., Denanglaire,S., Urbain,J., Leo,O., and Andris,F. (2006). CD4+ CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune responses to exogenous antigens. *Eur. J. Immunol.* 36, 855-863.
- Ehrlich,R. and Lemonnier,F.A. (2000). HFE--a novel nonclassical class I molecule that is involved in iron metabolism. *Immunity.* 13, 585-588.
- Eisenlohr,L.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (1992). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 481-487.
- Enari,M., Sakahira,H., Yokoyama,H., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Nagata,S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Epperson,D.E., Arnold,D., Spies,T., Cresswell,P., Pober,J.S., and Johnson,D.R. (1992). Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 3297-3301.
- Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Fallon,P.G., Ballantyne,S.J., Mangan,N.E., Barlow,J.L., Dasvarma,A., Hewett,D.R., McIlgorm,A., Jolin,H.E., and McKenzie,A.N. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J. Exp. Med.* 203, 1105-1116.
- Faria,A.M. and Weiner,H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunol. Rev.* 206, 232-259.

- Faroudi,M., Utzny,C., Salió,M., Cerundolo,V., Guiraud,M., Muller,S., and Valitutti,S. (2003). Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 14145-14150.
- Fasso,M., Anandasabapathy,N., Crawford,F., Kappler,J., Fathman,C.G., and Ridgway,W.M. (2000). T cell receptor (TCR)-mediated repertoire selection and loss of TCR vbeta diversity during the initiation of a CD4(+) T cell response in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1719-1730.
- Fitzgerald,K.A., McWhirter,S.M., Faia,K.L., Rowe,D.C., Latz,E., Golenbock,D.T., Coyle,A.J., Liao,S.M., and Maniatis,T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491-496.
- Fontenot,J.D., Rasmussen,J.P., Williams,L.M., Dooley,J.L., Farr,A.G., and Rudensky,A.Y. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22, 329-341.
- Freedman,A.S., Freeman,G.J., Rhyhart,K., and Nadler,L.M. (1991). Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol.* 137, 429-437.
- Friedl,P., den Boer,A.T., and Gunzer,M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 532-545.
- Galkina,E., Tanousis,K., Preece,G., Tolaini,M., Kioussis,D., Florey,O., Haskard,D.O., Tedder,T.F., and Ager,A. (2003). L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 198, 1323-1335.
- Gao,G.F., Tormo,J., Gerth,U.C., Weyer,J.R., McMichael,A.J., Stuart,D.I., Bell,J.I., Jones,E.Y., and Jakobsen,B.K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 387, 630-634.
- 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 alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.

Gautier,G., Humbert,M., Deauvieu,F., Sculler,M., Hiscott,J., Bates,E.E., Trinchieri,G., Caux,C., and Garrone,P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 201, 1435-1446.

Ge,Q., Rao,V.P., Cho,B.K., Eisen,H.N., and Chen,J. (2001). Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1728-1733.

Gershon,R.K. and Kondo,K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903-914.

Ghoreishi,M. and Dutz,J.P. (2006). Tolerance induction by transcutaneous immunization through ultraviolet-irradiated skin is transferable through CD4+CD25+ T regulatory cells and is dependent on host-derived IL-10. *J. Immunol.* 176, 2635-2644.

Goldrath,A.W., Sivakumar,P.V., Glaccum,M., Kennedy,M.K., Bevan,M.J., Benoist,C., Mathis,D., and Butz,E.A. (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 195, 1515-1522.

Grakoui,A., Bromley,S.K., Sumen,C., Davis,M.M., Shaw,A.S., Allen,P.M., and Dustin,M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Greaves,D.R., Wilson,F.D., Lang,G., and Kioussis,D. (1989). Human CD2 3'-flanking sequences confer high-level, T cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* 56, 979-986.

Green,E.A., Gorelik,L., McGregor,C.M., Tran,E.H., and Flavell,R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10878-10883.

Grewal, I.S. and Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 111-135.

Groothuis, T.A. and Neefjes, J. (2005). The many roads to cross-presentation. *J. Exp. Med.* 202, 1313-1318.

Grufman, P., Sandberg, J.K., Wolpert, E.Z., and Karre, K. (1999a). Immunization with dendritic cells breaks immunodominance in CTL responses against minor histocompatibility and synthetic peptide antigens. *J. Leukoc. Biol.* 66, 268-271.

Grufman, P., Wolpert, E.Z., Sandberg, J.K., and Karre, K. (1999b). T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 29, 2197-2204.

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 258-263.

Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., and van Lier, R.A. (1997). Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 186, 1407-1418.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180, 631-640.

Hayday, A.C. (2000). $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975-1026.

Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-

presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.* 199, 9-26.

Heath,W.R. and Carbone,F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47-64.

Heibein,J.A., Goping,I.S., Barry,M., Pinkoski,M.J., Shore,G.C., Green,D.R., and Bleackley,R.C. (2000). Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J. Exp. Med.* 192, 1391-1402.

Herter,S., Osterloh,P., Hilf,N., Rechtsteiner,G., Hohfeld,J., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2005). Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 175, 891-898.

Hofmann,M., Radsak,M., Rechtsteiner,G., Wiemann,K., Gunder,M., Bien-Grater,U., Offringa,R., Toes,R.E., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2004). T cell avidity determines the level of CTL activation. *Eur. J. Immunol.* 34, 1798-1806.

Hoglund,P. (2006). Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger. *Eur. J. Immunol.* 36, 264-266.

Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Horng,T., Barton,G.M., and Medzhitov,R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835-841.

Hsu,J.T., Wang,H.C., Chen,G.W., and Shih,S.R. (2006). Antiviral drug discovery targeting to viral proteases. *Curr. Pharm. Des* 12, 1301-1314.

Hu,H., Huston,G., Duso,D., Lepak,N., Roman,E., and Swain,S.L. (2001). CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. *Nat. Immunol.* 2, 705-710.

Huppa,J.B., Gleimer,M., Sumen,C., and Davis,M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* 4, 749-755.

- Iezzi,G., Frohlich,A., Ernst,B., Ampenberger,F., Saeland,S., Glaichenhaus,N., and Kopf,M. (2006). Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* *177*, 1250-1256.
- Irvine,D.J., Purbhoo,M.A., Krosgaard,M., and Davis,M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* *419*, 845-849.
- Itoh,M., Takahashi,T., Sakaguchi,N., Kuniyasu,Y., Shimizu,J., Otsuka,F., and Sakaguchi,S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* *162*, 5317-5326.
- Itoh,T. and Celis,E. (2005). Transcutaneous immunization with cytotoxic T-cell peptide epitopes provides effective antitumor immunity in mice. *J. Immunother.* *28*, 430-437.
- Iwasaki,A. and Medzhitov,R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* *5*, 987-995.
- Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M. (2001). *Immunobiology*. New York and London: Garland Science).
- Jang,M.H., Sougawa,N., Tanaka,T., Hirata,T., Hiroi,T., Tohya,K., Guo,Z., Umemoto,E., Ebisuno,Y., Yang,B.G., Seoh,J.Y., Lipp,M., Kiyono,H., and Miyasaka,M. (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* *176*, 803-810.
- Johnson,R., Streicher,E.M., Louw,G.E., Warren,R.M., van Helden,P.D., and Victor,T.C. (2006). Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Issues Mol. Biol.* *8*, 97-111.
- Kaech,S.M. and Ahmed,R. (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* *2*, 415-422.
- Kaech,S.M., Hemby,S., Kersh,E., and Ahmed,R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* *111*, 837-851.

- Kaech,S.M., Tan,J.T., Wherry,E.J., Konieczny,B.T., Surh,C.D., and Ahmed,R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* *4*, 1191-1198.
- Kassiotis,G., Garcia,S., Simpson,E., and Stockinger,B. (2002). Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat. Immunol.* *3*, 244-250.
- Kassiotis,G., Zamoyska,R., and Stockinger,B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *J. Exp. Med.* *197*, 1007-1016.
- Kast,W.M., Offringa,R., Peters,P.J., Voordouw,A.C., Meloen,R.H., van der Eb,A.J., and Melief,C.J. (1989). Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* *59*, 603-614.
- Kawai,T., Takeuchi,O., Fujita,T., Inoue,J., Muhlradt,P.F., Sato,S., Hoshino,K., and Akira,S. (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* *167*, 5887-5894.
- Kedl,R.M., Kappler,J.W., and Murrack,P. (2003). Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 120-127.
- Kedl,R.M., Rees,W.A., Hildeman,D.A., Schaefer,B., Mitchell,T., Kappler,J., and Murrack,P. (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* *192*, 1105-1113.
- Kedl,R.M., Schaefer,B.C., Kappler,J.W., and Murrack,P. (2002). T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 27-32.
- Kedzierska,K., La Gruta,N.L., Davenport,M.P., Turner,S.J., and Doherty,P.C. (2005). Contribution of T cell receptor affinity to overall avidity for virus-specific CD8+ T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 11432-11437.
- Keene,J.A. and Forman,J. (1982). Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *155*, 768-782.

- Kersh,E.N., Kaech,S.M., Onami,T.M., Moran,M., Wherry,E.J., Miceli,M.C., and Ahmed,R. (2003). TCR signal transduction in antigen-specific memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 170, 5455-5463.
- Khazaie,K. and von Boehmer,H. (2006). The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16, 124-136.
- Kieper,W.C., Tan,J.T., Bondi-Boyd,B., Gapin,L., Sprent,J., Ceredig,R., and Surh,C.D. (2002). Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 195, 1533-1539.
- Kimura,A., Israel,A., Le Bail,O., and Kourilsky,P. (1986). Detailed analysis of the mouse H-2Kb promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44, 261-272.
- Kirberg,J., Berns,A., and von Boehmer,H. (1997). Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J. Exp. Med.* 186, 1269-1275.
- Kissenpfennig,A., Henri,S., Dubois,B., Laplace-Builhe,C., Perrin,P., Romani,N., Tripp,C.H., Douillard,P., Leserman,L., Kaiserlian,D., Saeland,S., Davoust,J., and Malissen,B. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 22, 643-654.
- Kissenpfennig,A. and Malissen,B. (2006). Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol.* 27, 132-139.
- Kloetzel,P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 5, 661-669.
- Ko,K., Yamazaki,S., Nakamura,K., Nishioka,T., Hirota,K., Yamaguchi,T., Shimizu,J., Nomura,T., Chiba,T., and Sakaguchi,S. (2005). Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 202, 885-891.
- Kohm,A.P., McMahon,J.S., Podojil,J.R., Begolka,W.S., Degutes,M., Kasprovicz,D.J., Ziegler,S.F., and Miller,S.D. (2006). Cutting Edge: Anti-CD25 Monoclonal Antibody

Injection Results in the Functional Inactivation, Not Depletion, of CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* 176, 3301-3305.

Kontgen,F., Suss,G., Stewart,C., Steinmetz,M., and Bluethmann,H. (1993). Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int. Immunol.* 5, 957-964.

Krummel,M.F. and Davis,M.M. (2002). Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 66-74.

Ku,C.C., Murakami,M., Sakamoto,A., Kappler,J., and Marrack,P. (2000). Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288, 675-678.

Kuhober,A., Pudollek,H.P., Reifenberg,K., Chisari,F.V., Schlicht,H.J., Reimann,J., and Schirmbeck,R. (1996). DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J. Immunol.* 156, 3687-3695.

Kundig,T.M., Bachmann,M.F., Oehen,S., Hoffmann,U.W., Simard,J.J., Kalberer,C.P., Pircher,H., Ohashi,P.S., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (1996). On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9716-9723.

La Gruta,N.L., Kedzierska,K., Pang,K., Webby,R., Davenport,M., Chen,W., Turner,S.J., and Doherty,P.C. (2006). A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Labrecque,N., Whitfield,L.S., Obst,R., Waltzinger,C., Benoist,C., and Mathis,D. (2001). How much TCR does a T cell need? *Immunity.* 15, 71-82.

Lafferty,K.J. and Cunningham,A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 53, 27-42.

Lauvau,G., Vijn,S., Kong,P., Horng,T., Kerksiek,K., Serbina,N., Tuma,R.A., and Pamer,E.G. (2001). Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* 294, 1735-1739.

Le Bon,A., Etchart,N., Rossmann,C., Ashton,M., Hou,S., Gewert,D., Borrow,P., and Tough,D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat. Immunol.* 4, 1009-1015.

- Lee,K.H., Holdorf,A.D., Dustin,M.L., Chan,A.C., Allen,P.M., and Shaw,A.S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Lefrancois,L., Marzo,A., and Williams,K. (2003). Sustained response initiation is required for T cell clonal expansion but not for effector or memory development in vivo. *J. Immunol.* 171, 2832-2839.
- Lefrancois,L. and Marzo,A.L. (2006). The descent of memory T-cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 618-623.
- Lelouard,H., Ferrand,V., Marguet,D., Bania,J., Camosseto,V., David,A., Gatti,E., and Pierre,P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* 164, 667-675.
- Lelouard,H., Gatti,E., Cappello,F., Gresser,O., Camosseto,V., and Pierre,P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417, 177-182.
- Liu,H., Rhodes,M., Wiest,D.L., and Vignali,D.A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 13, 665-675.
- Liu,X., Li,P., Widlak,P., Zou,H., Luo,X., Garrard,W.T., and Wang,X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8461-8466.
- Liu,X., Zou,H., Slaughter,C., and Wang,X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Lowy,D.R. and Schiller,J.T. (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest* 116, 1167-1173.
- Luo,G., Cianci,C., Harte,W., and Krystal,M. (1999). Conquering influenza: recent advances in anti-influenza drug discovery. *IDrugs.* 2, 671-685.

- Macagno,A., Molteni,M., Rinaldi,A., Bertoni,F., Lanzavecchia,A., Rossetti,C., and Sallusto,F. (2006). A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *J. Exp. Med.* *203*, 1481-1492.
- Maenaka,K. and Jones,E.Y. (1999). MHC superfamily structure and the immune system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 745-753.
- Mangan,P.R., Harrington,L.E., O'Quinn,D.B., Helms,W.S., Bullard,D.C., Elson,C.O., Hatton,R.D., Wahl,S.M., Schoeb,T.R., and Weaver,C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231-234.
- Maraskovsky,E., Teepe,M., Morrissey,P.J., Braddy,S., Miller,R.E., Lynch,D.H., and Peschon,J.J. (1996). Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J. Immunol.* *157*, 5315-5323.
- Martin,S.J., Amarante-Mendes,G.P., Shi,L., Chuang,T.H., Casiano,C.A., O'Brien,G.A., Fitzgerald,P., Tan,E.M., Bokoch,G.M., Greenberg,A.H., and Green,D.R. (1996). The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* *15*, 2407-2416.
- Marzo,A.L., Klonowski,K.D., Le Bon,A., Borrow,P., Tough,D.F., and Lefrancois,L. (2005). Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat. Immunol.* *6*, 793-799.
- Masopust,D., Vezys,V., Marzo,A.L., and Lefrancois,L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* *291*, 2413-2417.
- Matsushima,H., Yamada,N., Matsue,H., and Shimada,S. (2004). TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* *173*, 531-541.
- McHugh,R.S., Whitters,M.J., Piccirillo,C.A., Young,D.A., Shevach,E.M., Collins,M., and Byrne,M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* *16*, 311-323.

McNicholl,I.R. and McNicholl,J.J. (2006). On the horizon: promising investigational antiretroviral agents. *Curr. Pharm. Des* 12, 1091-1103.

Medana,I.M., Gallimore,A., Oxenius,A., Martinic,M.M., Wekerle,H., and Neumann,H. (2000). MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8+ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* 30, 3623-3633.

Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258.

Mempel,M., Voelcker,V., Kollisch,G., Plank,C., Rad,R., Gerhard,M., Schnopp,C., Fraunberger,P., Walli,A.K., Ring,J., Abeck,D., and Ollert,M. (2003). Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J. Invest Dermatol.* 121, 1389-1396.

Miller,M.J., Hejazi,A.S., Wei,S.H., Cahalan,M.D., and Parker,I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 998-1003.

Mitragotri,S. (2005). Immunization without needles. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 905-916.

Mitsui,H., Watanabe,T., Saeki,H., Mori,K., Fujita,H., Tada,Y., Asahina,A., Nakamura,K., and Tamaki,K. (2004). Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 122, 95-102.

Momburg,F., Neefjes,J.J., and Hammerling,G.J. (1994). Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 32-37.

- Monks,C.R., Freiberg,B.A., Kupfer,H., Sciaky,N., and Kupfer,A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moser,B. and Brandes,M. (2006). Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol.* 27, 112-118.
- Muller,C. and Tschopp,J. (1994). Resistance of CTL to perforin-mediated lysis. Evidence for a lymphocyte membrane protein interacting with perforin. *J. Immunol.* 153, 2470-2478.
- Munoz-Fernandez,M.A., Fernandez,M.A., and Fresno,M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22, 301-307.
- Murali-Krishna,K., Altman,J.D., Suresh,M., Sourdive,D.J., Zajac,A.J., Miller,J.D., Slansky,J., and Ahmed,R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 8, 177-187.
- Murali-Krishna,K., Lau,L.L., Sambhara,S., Lemonnier,F., Altman,J., and Ahmed,R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-1381.
- Napolitani,G., Rinaldi,A., Bertoni,F., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.*
- Neijssen,J., Herberts,C., Drijfhout,J.W., Reits,E., Janssen,L., and Neefjes,J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83-88.
- Nesic,D. and Vukmanovic,S. (1998). MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J. Immunol.* 160, 3705-3712.
- Noelle,R.J. (1996). CD40 and its ligand in host defense. *Immunity.* 4, 415-419.

Northrop,J.K., Thomas,R.M., Wells,A.D., and Shen,H. (2006). Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J. Immunol.* *177*, 1062-1069.

O'Garra,A. and Arai,N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* *10*, 542-550.

O'Neill,L.A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 3-9.

Opferman,J.T., Ober,B.T., and Ashton-Rickardt,P.G. (1999). Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* *283*, 1745-1748.

Owyang,A.M., Zaph,C., Wilson,E.H., Guild,K.J., McClanahan,T., Miller,H.R., Cua,D.J., Goldschmidt,M., Hunter,C.A., Kastelein,R.A., and Artis,D. (2006). Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* *203*, 843-849.

Parish,C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* *77*, 499-508.

Parker,D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* *11*, 331-360.

Pasare,C. and Medzhitov,R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* *299*, 1033-1036.

Piccirillo,C.A., Letterio,J.J., Thornton,A.M., McHugh,R.S., Mamura,M., Mizuhara,H., and Shevach,E.M. (2002). CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* *196*, 237-246.

Pieters,J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 89-96.

Podack,E.R. (1999). How to induce involuntary suicide: the need for dipeptidyl peptidase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 8312-8314.

Power,E. (2006). Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. *Clin. Microbiol. Infect.* 12 *Suppl* 5, 25-34.

Probst,H.C., Tschannen,K., Gallimore,A., Martinic,M., Basler,M., Dumrese,T., Jones,E., and van den Broek,M.F. (2003). Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by the kinetics of viral protein expression. *J. Immunol.* 171, 5415-5422.

Purbhoo,M.A., Irvine,D.J., Huppa,J.B., and Davis,M.M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* 5, 524-530.

Quinn,T., O'Mahony,R., Baird,A.W., Drudy,D., Whyte,P., and Fanning,S. (2006). Multi-drug resistance in *Salmonella enterica*: efflux mechanisms and their relationships with the development of chromosomal resistance gene clusters. *Curr. Drug Targets.* 7, 849-860.

Rahal,J.J. (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* 43 *Suppl* 2, S95-S99.

Rammensee,H.G. (2006). Some considerations on the use of peptides and mRNA for therapeutic vaccination against cancer. *Immunol. Cell Biol.* 84, 290-294.

Randolph,G.J., Angeli,V., and Swartz,M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 617-628.

Rappuoli,R. (2004). From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat. Med.* 10, 1177-1185.

Rechtsteiner,G., Warger,T., Osterloh,P., Schild,H., and Radsak,M.P. (2005). Cutting Edge: Priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *J. Immunol.* 174, 2476-2480.

Rees,W., Bender,J., Teague,T.K., Kedl,R.M., Crawford,F., Marrack,P., and Kappler,J. (1999). An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9781-9786.

Reinhardt,R.L., Khoruts,A., Merica,R., Zell,T., and Jenkins,M.K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101-105.

Renn,C.N., Sanchez,D.J., Ochoa,M.T., Legaspi,A.J., Oh,C.K., Liu,P.T., Krutzik,S.R., Sieling,P.A., Cheng,G., and Modlin,R.L. (2006). TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J. Immunol.* 177, 298-305.

Reth,M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.

Rice,L.B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am. J. Infect. Control* 34, S11-S19.

Ridge,J.P., Di Rosa,F., and Matzinger,P. (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.

Rifa'i,M., Kawamoto,Y., Nakashima,I., and Suzuki,H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J. Exp. Med.* 200, 1123-1134.

Rocha,B. and Tanchot,C. (2004). Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 259-263.

Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 588-593.

Rogers,P.R., Dubey,C., and Swain,S.L. (2000). Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J. Immunol.* 164, 2338-2346.

Rooke,R., Waltzinger,C., Benoist,C., and Mathis,D. (1997). Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity.* 7, 123-134.

Rouse,B.T., Sarangi,P.P., and Suvas,S. (2006). Regulatory T cells in virus infections. *Immunol. Rev.* 212, 272-286.

Rowen,L., Koop,B.F., and Hood,L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.

Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151-1164.

Sakahira,H., Enari,M., and Nagata,S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 177, 134-140.

Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., and Lanzavecchia,A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Sapijaszko,M.J. (2005). Imiquimod 5% cream (Aldara) in the treatment of basal cell carcinoma. *Skin Therapy. Lett.* 10, 2-5.

Savage,P.A., Boniface,J.J., and Davis,M.M. (1999). A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity.* 10, 485-492.

Schiller,M., Metze,D., Luger,T.A., Grabbe,S., and Gunzer,M. (2006). Immune response modifiers--mode of action. *Exp. Dermatol.* 15, 331-341.

Schluns,K.S., Kieper,W.C., Jameson,S.C., and Lefrancois,L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 1, 426-432.

Schoenberger,S.P., Toes,R.E., van der Voort,E.I., Offringa,R., and Melief,C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.

Schroder,M. and Bowie,A.G. (2005). TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol.* 26, 462-468.

Schrum,A.G., Turka,L.A., and Palmer,E. (2003). Surface T-cell antigen receptor expression and availability for long-term antigenic signaling. *Immunol. Rev.* 196, 7-24.

Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Schulz,O., Diebold,S.S., Chen,M., Naslund,T.I., Nolte,M.A., Alexopoulou,L., Azuma,Y.T., Flavell,R.A., Liljestrom,P., and Reis e Sousa (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.

Schuurhuis,D.H., van Montfoort,N., Ioan-Facsinay,A., Jiawan,R., Camps,M., Nouta,J., Melief,C.J., Verbeek,J.S., and Ossendorp,F. (2006). Immune complex-loaded dendritic cells are superior to soluble immune complexes as antitumor vaccine. *J. Immunol.* 176, 4573-4580.

Seddon,B. and Mason,D. (2000). The third function of the thymus. *Immunol. Today* 21, 95-99.

Seder,R.A. and Ahmed,R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat. Immunol.* 4, 835-842.

Serghides,L., Bukczynski,J., Wen,T., Wang,C., Routy,J.P., Boulassel,M.R., Sekaly,R.P., Ostrowski,M., Bernard,N.F., and Watts,T.H. (2005). Evaluation of OX40 ligand as a costimulator of human antiviral memory CD8 T cell responses: comparison with B7.1 and 4-1BBL. *J. Immunol.* 175, 6368-6377.

Sette,A., Vitiello,A., Reherman,B., Fowler,P., Nayersina,R., Kast,W.M., Melief,C.J., Oseroff,C., Yuan,L., Ruppert,J., and . (1994). The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 153, 5586-5592.

Shedlock,D.J. and Shen,H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.

Shevach,E.M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 389-400.

Shevach,E.M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 25, 195-201.

Shevach,E.M., Thornton,A., and Suri-Payer,E. (1998). T lymphocyte-mediated control of autoimmunity. *Novartis. Found. Symp.* 215, 200-211.

Shi,L., Chen,G., MacDonald,G., Bergeron,L., Li,H., Miura,M., Rotello,R.J., Miller,D.K., Li,P., Seshadri,T., Yuan,J., and Greenberg,A.H. (1996). Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 11002-11007.

Shinkai,Y., Rathbun,G., Lam,K.P., Oltz,E.M., Stewart,V., Mendelsohn,M., Charron,J., Datta,M., Young,F., Stall,A.M., and . (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.

Shortman,K., Egerton,M., Spangrude,G.J., and Scollay,R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 2, 3-12.

Smalley,D.M. and Ley,K. (2005). L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell Mol. Med.* 9, 255-266.

Sourdive,D.J., Murali-Krishna,K., Altman,J.D., Zajac,A.J., Whitmire,J.K., Pannetier,C., Kourilsky,P., Evavold,B., Sette,A., and Ahmed,R. (1998). Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J. Exp. Med.* 188, 71-82.

Sprent,J. (1973). Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. *Cell Immunol.* 7, 10-39.

Srivastava,P.K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 201-205.

St Johnston,D. and Nusslein-Volhard,C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-219.

Starr,T.K., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139-176.

Stebbing,J., Hatzimichael,E., Bower,M., and Winston,A. (2005). The rationale and development of new drugs to treat HIV infection. *Med. Chem.* 1, 635-642.

Stout,R.D. and Bottomly,K. (1989). Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J. Immunol.* 142, 760-765.

Strasser,A. (1995). Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 228-234.

Suda,T., Takahashi,T., Golstein,P., and Nagata,S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.

Sun,J.C. and Bevan,M.J. (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.

Surh,C.D. and Sprent,J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-103.

Sutton,V.R., Davis,J.E., Cancilla,M., Johnstone,R.W., Ruefli,A.A., Sedelies,K., Browne,K.A., and Trapani,J.A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J. Exp. Med.* 192, 1403-1414.

Suvas,S., Kumaraguru,U., Pack,C.D., Lee,S., and Rouse,B.T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J. Exp. Med.* 198, 889-901.

Suvas,S. and Rouse,B.T. (2006). Treg control of antimicrobial T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 344-348.

Suzuki,H., Wang,B., Shivji,G.M., Toto,P., Amerio,P., Tomai,M.A., Miller,R.L., and Sauder,D.N. (2000). Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J. Invest Dermatol.* 114, 135-141.

Swain,S.L., Hu,H., and Huston,G. (1999). Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286, 1381-1383.

Takeda,S., Rodewald,H.R., Arakawa,H., Bluethmann,H., and Shimizu,T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity*. 5, 217-228.

Talanian,R.V., Yang,X., Turbov,J., Seth,P., Ghayur,T., Casiano,C.A., Orth,K., and Froelich,C.J. (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* 186, 1323-1331.

Tan,J.T., Dudl,E., LeRoy,E., Murray,R., Sprent,J., Weinberg,K.I., and Surh,C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8732-8737.

Tan,J.T., Ernst,B., Kieper,W.C., LeRoy,E., Sprent,J., and Surh,C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J. Exp. Med.* 195, 1523-1532.

Tanchot,C., Lemonnier,F.A., Perarnau,B., Freitas,A.A., and Rocha,B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.

Tang,Q., Boden,E.K., Henriksen,K.J., Bour-Jordan,H., Bi,M., and Bluestone,J.A. (2004). Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2996-3005.

Tato,C.M., Laurence,A., and O'Shea,J.J. (2006). Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi! *J. Exp. Med.* 203, 809-812.

Tato,C.M. and O'Shea,J.J. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441, 166-168.

Thatcher,T.H., Luzina,I., Fischelevich,R., Tomai,M.A., Miller,R.L., and Gaspari,A.A. (2006). Topical imiquimod treatment prevents UV-light induced loss of contact hypersensitivity and immune tolerance. *J. Invest Dermatol.* 126, 821-831.

Thomas,D.A., Du,C., Xu,M., Wang,X., and Ley,T.J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity*. 12, 621-632.

- Thornton,A.M. and Shevach,E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* *164*, 183-190.
- Toes,R.E., Offringa,R., Blom,R.J., Melief,C.J., and Kast,W.M. (1996). Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 7855-7860.
- Tough,D.F. and Sprent,J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* *179*, 1127-1135.
- Tripp,R.A., Hou,S., and Doherty,P.C. (1995). Temporal loss of the activated L-selectin-low phenotype for virus-specific CD8+ memory T cells. *J. Immunol.* *154*, 5870-5875.
- Troy,A.E. and Shen,H. (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J. Immunol.* *170*, 672-676.
- Turk,M.J., Guevara-Patino,J.A., Rizzuto,G.A., Engelhorn,M.E., Sakaguchi,S., and Houghton,A.N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J. Exp. Med.* *200*, 771-782.
- Turner,D. and Wainberg,M.A. (2006). HIV transmission and primary drug resistance. *AIDS Rev.* *8*, 17-23.
- Valitutti,S., Dessing,M., Aktories,K., Gallati,H., and Lanzavecchia,A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* *181*, 577-584.
- Valitutti,S., Muller,S., Dessing,M., and Lanzavecchia,A. (1996). Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* *183*, 1917-1921.
- van der Burg,S.H., Bijker,M.S., Welters,M.J., Offringa,R., and Melief,C.J. (2006). Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2, 423-429.
- Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naive and memory CD8⁺ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* 1, 47-53.
- Viola, A., Contento, R.L., and Molon, B. (2006). T cells and their partners: the chemokine dating agency. *Trends Immunol.* 27, 421-427.
- Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A., Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity.* 10, 559-568.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6, 338-344.
- von Boehmer, H. and Kisielow, P. (1993). Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection. *Cell* 73, 207-208.
- Wade, R.C. (1997). 'Flu' and structure-based drug design. *Structure.* 5, 1139-1145.
- Warger, T., Osterloh, P., Rechtsteiner, G., Fassbender, M., Heib, V., Schmid, B., Schmitt, E., Schild, H., and Radsak, M.P. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 108, 544-550.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Weil, R. and Israel, A. (2004). T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 374-381.
- Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaech, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* 4, 225-234.

- Wilcox,R.A., Tamada,K., Flies,D.B., Zhu,G., Chapoval,A.I., Blazar,B.R., Kast,W.M., and Chen,L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103, 177-184.
- Williams,M.A., Holmes,B.J., Sun,J.C., and Bevan,M.J. (2006). Developing and maintaining protective CD8+ memory T cells. *Immunol. Rev.* 211, 146-153.
- Willis,R.A., Kappler,J.W., and Marrack,P.C. (2006). CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 12063-12068.
- Winau,F., Weber,S., Sad,S., de Diego,J., Hoops,S.L., Breiden,B., Sandhoff,K., Brinkmann,V., Kaufmann,S.H., and Schaible,U.E. (2006). Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.* 24, 105-117.
- Witherden,D., van Oers,N., Waltzinger,C., Weiss,A., Benoist,C., and Mathis,D. (2000). Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 191, 355-364.
- Wolpert,E.Z., Grufman,P., Sandberg,J.K., Tegnesjo,A., and Karre,K. (1998). Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 161, 4499-4505.
- Wu,C.Y., Kirman,J.R., Rotte,M.J., Davey,D.F., Perfetto,S.P., Rhee,E.G., Freidag,B.L., Hill,B.J., Douek,D.C., and Seder,R.A. (2002). Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 852-858.
- Yajima,T., Nishimura,H., Sad,S., Shen,H., Kuwano,H., and Yoshikai,Y. (2005). A novel role of IL-15 in early activation of memory CD8+ CTL after reinfection. *J. Immunol.* 174, 3590-3597.
- Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K., and Akira,S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yang,X., Stennicke,H.R., Wang,B., Green,D.R., Janicke,R.U., Srinivasan,A., Seth,P., Salvesen,G.S., and Froelich,C.J. (1998). Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J. Biol. Chem.* 273, 34278-34283.

Yewdell,J. (2002). To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol. Immunol.* 39, 139-146.

Yewdell,J.W. and Bennink,J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 51-88.

Yewdell,J.W., Schubert,U., and Bennink,J.R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114, 845-851.

Zamoyska,R. (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* 10, 82-87.

Zimmerman,C., Brduscha-Riem,K., Blaser,C., Zinkernagel,R.M., and Pircher,H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J. Exp. Med.* 183, 1367-1375.

Zimmermann,C., Prevost-Blondel,A., Blaser,C., and Pircher,H. (1999). Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences. *Eur. J. Immunol.* 29, 284-290.

Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27, 51-177.

9. Abkürzungen

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Lösung
AP-1	Activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-cyanine 7
APCs	Antigen Presenting Cells
B6	C57BL/6
BD	Becton Dickinson
BMDCs	Bone Marrow-Derived Dendritic Cells
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Caspase-activated DNase
CCL	CC Chemokin Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary determining region
CFSE	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTLA-4	CTL activation associated protein 4
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes
DAG	Diacylglycerol
DCs	Dendritic Cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	desoxynucleosid Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	extracellular signal-regulated kinase
FACS	Flourescent Activated Cell Sorting
FADD	Fas activated death domain
Fc	crystallizable fragment
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FoxP3	forkhead box protein P3
GITR	glucorticoid-induced tumor necrosis factor family-related protein
GM-CSF	Granulocyte/ Macrophage Colony Stimulating Factor
Grb-2	growth factor receptor-bound protein 2
[³ H]-Thymidin	Tritium markiertes Thymidin
HEV	high endothelial venules
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukocyte Antigens
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAD	Inhibitor of CAD
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IP3	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
IRF-3	interferon regulatory factor 3
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LAT	linker for activation of T cells

9. Abkürzungen

LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
MAP	mitogen activated kinase
MEM	minimum essential medium
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	nuclear factor κ B
NK	Natürliche Killerzelle
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-cyanine 7
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
p(I:C)	Poly-inosine Poly-cytidylitic Acid
PIP3	Phosphatidylinositol-1,4,5-trisphosphat
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetate
RAG	recombination activating genes
PLC- γ	Phospholipase C- γ
PKC- θ	Protein Kinase C- θ
PRR	Pattern Recognition Receptor
R	Rezeptor
RIG	retinoic acid-induced protein
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SFI	spezific fluorescence intensity
SLP76	SRC-homology-2domain-containing leukocyte protein of 76 kDa
SOS	son of sevenless
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TAP	Transporter Associated With Antigen Processing
T _{CM}	zentrale Gedächtniszellen
TCR	T Cell Receptor
TEC	Thymic epithelial cell
T _{EM}	Effektorgedächtniszellen
TGF	transforming growth factor
Th	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1 receptor homology domain
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
T _{reg}	regulatorsiche T-Zelle
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
ZAP-70	ζ -chain-associated protein kinase 70