

**Untersuchungen zur  
Rolle von B-Zellen bei der  
Toleranzinduktion  
in CD8-T-Zellen *in vivo***

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilian-Universität  
München

vorgelegt von  
Melanie Werner  
aus Augsburg

München, 31. Mai 2005

Erstgutachter:	Prof. Dr. E. Weiß
Zweitgutachter:	PD. Dr. Ch. Falk
Drittgutachter:	Prof. Dr. C. David
Viertgutachter:	PD. Dr. R. Brack-Werner
Betreuer der Arbeit: (Sondergutachter)	Prof. Dr. T. Brocker

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2005

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse flossen in folgende Publikationen ein:

**Werner M**, Kraunus J, Baum C and Brocker T (2004): B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element. *Gene Ther*, 11(12): 992-1000

**Werner M** and Brocker T: (2005) Tolerance induction in CD8 T cells by gene-modified B cells. *Manuskript in Vorbereitung*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
3.1	EINFÜHRUNG IN DAS IMMUNSYSTEM .....	11
3.2	DIE INDUKTION EINER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT UND DIE ROLLE DER ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN.....	11
3.2.1	<i>Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen .....</i>	<i>12</i>
3.2.1.1	Makrophagen.....	12
3.2.1.2	Dendritische Zellen.....	12
3.2.1.3	B-Zellen .....	13
3.3	DIE FUNKTION UND ENTWICKLUNG DER T-ZELLEN.....	17
3.3.1	<i>Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....</i>	<i>17</i>
3.3.2	<i>Die Funktion, Aktivierung und Differenzierung von CD8-T-Zellen.....</i>	<i>18</i>
3.3.3	<i>Die Funktion, Aktivierung und Differenzierung von CD4-T-Zellen.....</i>	<i>20</i>
3.3.4	<i>Die T-Zellentwicklung .....</i>	<i>21</i>
3.4	DIE TOLERANZINDUKTION IN T-ZELLEN.....	22
3.4.1	<i>Grundlagen der Toleranzinduktion .....</i>	<i>22</i>
3.4.2	<i>Die zentrale Toleranzinduktion .....</i>	<i>24</i>
3.4.2.1	Die negative Selektion.....	24
3.4.2.2	Anergisierung und regulatorische T-Zellen .....	25
3.4.3	<i>Periphere Toleranzinduktion .....</i>	<i>25</i>
3.4.3.1	Intrinsische Mechanismen.....	26
3.4.3.2	Extrinsische Mechanismen.....	27
3.4.4	<i>Die Rolle der B-Zelle bei der Toleranzinduktion in T-Zellen .....</i>	<i>28</i>
3.5	GENTRANSFER DURCH RETROVIRALE VEKTOREN .....	30
3.5.1	<i>Der retrovirale Lebenszyklus .....</i>	<i>30</i>
3.5.2	<i>Struktur eines Retrovirus.....</i>	<i>31</i>
3.5.3	<i>Retrovirale Vektoren .....</i>	<i>32</i>
3.5.4	<i>Virale posttranskriptionell regulatorische Elemente .....</i>	<i>35</i>
3.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT UND ARBEITSPROGRAMM.....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>38</b>
4.1	MATERIAL.....	38
4.1.1	<i>Antikörper.....</i>	<i>38</i>
4.1.2	<i>Chemikalien .....</i>	<i>39</i>
4.1.3	<i>Geräte .....</i>	<i>39</i>

---

4.1.4	<i>Lösungen und Medien</i> .....	39
4.1.5	<i>Mausstämme</i> .....	45
4.1.6	<i>Peptide, Proteine und Oligonukleotide</i> .....	46
4.1.7	<i>Vektoren</i> .....	46
4.1.7.1	DNA-Immunisierungs-Vektoren .....	46
4.1.7.2	Herpes Simplex Vektoren .....	46
4.1.7.3	Klonierungsvektor .....	47
4.1.7.4	Retrovirale Vektoren .....	47
4.1.8	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	49
4.2	METHODEN .....	49
4.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	49
4.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	49
4.2.1.2	Bakterienkultur.....	50
4.2.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	50
4.2.1.4	Herstellung chemokompetenter Bakterien .....	50
4.2.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	51
4.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA.....	51
4.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	51
4.2.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
4.2.1.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	53
4.2.1.10	Transformation chemokompetenter Bakterien.....	53
4.2.2	<i>Zell- und immunbiologische Methoden</i> .....	54
4.2.2.1	Adoptiver Zelltransfer .....	54
4.2.2.2	Bestimmung des viralen Titers .....	54
4.2.2.3	CFSE-Färbung .....	55
4.2.2.4	Durchflusszytometrie (FACS Analyse).....	55
4.2.2.5	Entnahme von Blutproben und Organen der Maus .....	58
4.2.2.6	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA).....	59
4.2.2.7	Generierung von CD8-Gedächtniszellen.....	60
4.2.2.8	Generierung von Knochenmarkschimären.....	60
4.2.2.9	Generierung von retroviralen Vektorüberständen .....	61
4.2.2.10	Immunisierungen .....	61
4.2.2.11	<i>In-Vitro</i> -Kreuzpräsentationstest.....	63
4.2.2.12	<i>In- Vivo</i> -Zytotoxizitätstest.....	63
4.2.2.13	Kultivierung von Phoenix-eco und NIH3T3-Zellen.....	64
4.2.2.14	Kultur von Dendritischen Zellen .....	64
4.2.2.15	Kultur von HSPC .....	65
4.2.2.16	Magnetische Zellseparation (MACS).....	65
4.2.2.17	Messung der Zellproliferation <i>in vitro</i> .....	66
4.2.2.18	Proteintransfer und Proteindetektion auf einer PVDF-Membran, (Western-Blot).....	66
4.2.2.19	SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese).....	67
4.2.2.20	Statistik .....	68
4.2.2.21	Transduktion von HSPC.....	68

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>69</b>
5.1	EINFLUSS EINES POSTTRANSKRIPTIONELL REGULATORISCHEN ELEMENTS AUF SIN-VEKTOREN .....	69
5.2	ENTWICKLUNG EINES SIN-VEKTORS MIT B-ZELLSPEZIFISCHER TRANSGEN-EXPRESSION .....	74
5.3	HYBRID-LTR-VEKTOREN .....	80
5.4	B-ZELLSPEZIFISCHE EXPRESSION EINES MODELLANTIGENS <i>IN VIVO</i> .....	84
5.4.1	<i>In-Vivo-Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires</i> .....	85
5.4.2	<i>In-Vitro- und In-Vivo-Analyse der operierenden Toleranzmechanismen</i> .....	88
5.4.2.1	Zentrale oder periphere Toleranz .....	88
5.4.2.2	Klonale oder funktionelle Deletion .....	91
5.4.2.3	Direkte oder indirekte Tolerisierung .....	95
5.4.3	<i>Tolerisierung von CD8-Gedächtniszellen</i> .....	100
5.4.4	<i>Auswirkung einer subletalen Bestrahlung auf die Toleranzinduktion</i> .....	103
5.4.5	<i>Quantitative Bestimmung von sOVA</i> .....	105
5.4.6	<i>B-Zelltoleranz</i> .....	105
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>107</b>
6.1	EINFLUSS VON WPRE AUF DIE EIGENSCHAFTEN VON SIN-VEKTOREN .....	107
6.2	ENTWICKLUNG EINES SIN-VEKTORS MIT B-ZELLSPEZIFISCHER TRANSGENEXPRESSION .....	109
6.3	EXPERIMENTELLER ANSATZ ZUR <i>IN-VIVO</i> -TOLERISIERUNG VON CD8-T-ZELLEN .....	111
6.3.1	<i>In-Vivo-Tolerisierung eines polyklonalen oder transgenen CD8-T-Zellrepertoires</i> .....	112
6.3.2	<i>Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion</i> .....	116
6.3.3	<i>Einfluss einer selektiven Antigenexpression in B-Zellen auf die B-Zellantwort</i> .....	121
6.4	THERAPEUTISCHE BETRACHTUNGEN .....	123
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>154</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>156</b>

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> ) oder <i>Allophycocyanin</i> in Zusammenhang mit der Durchflusszytometrie
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod ( <i>activation-induced cell death</i> )
AIRE	Auto-Immun-Regulator Protein
BCR	B-Zellrezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
CMV	Cytomegalovirus
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans ( <i>complete Freund's adjuvans</i> )
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester
cTECs	Epithelzellen im Kortex des Thymus ( <i>cortical thymic epithelial cells</i> )
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
FBS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fc, FcR	kristallisierbares Fragment ( <i>Fragment crystallizable</i> ), Fc-Rezeptor
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanate</i>
5-FU	5-Fluoro-Uracil
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>human leukocyte antigen</i> )
HPRE	posttranskriptionell regulatorisches Element des humanen Hepatitis B Virus ( <i>hepatitis B posttranscriptional regulatory element</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSPC	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ( <i>hematopoietic stem and progenitor cells</i> )
HSV	Herpes Simplex Virus
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvans ( <i>incomplete Freund's adjuvans</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

## Abkürzungsverzeichnis

---

ILT-3 or ILT-4	inhibitorisches Ig-verwandtes Transkript 3 oder 4 ( <i>inhibitory Ig-like transcript 3 or 4</i> )
IFN- $\alpha/\beta$	Interferon- $\alpha/\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
i.p. / i.v.	intraperitoneal / intravenös
KLH	Hämozyanin von <i>Megathura crenulata</i> ( <i>keyhole limpets hemocyanin</i> )
LTR	lange terminale Wiederholung ( <i>long-terminal repeat</i> )
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MOI	Vielzahl der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
mTECs	Epithelzellen in der Medulla des Thymus ( <i>medullary thymic epithelial cells</i> )
OD	Optische Dichte
OVA	Hühnerei-Albumin
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>buffered saline solution</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlophyll-a Protein
PFA	Paraformaldehyd
PRRs	Rezeptoren zur Erkennung von PAMPs ( <i>pattern-recognition receptors</i> )
RIP	Insulin-Promotor aus der Ratte ( <i>rat insulin promoter</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SFFV	<i>spleen-focus forming virus</i>
SIN	Selbst-Inaktivierend ( <i>self-inactivating</i> )
SIINFEKL	OVA <sub>257-264</sub>
s.c.	subkutan
sOVA	sezerniertes OVA ( <i>soluble secreted OVA</i> )
TCR	T-Zellrezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )



TI	Transgenexpressions-Index
T <sub>h1</sub>	T-Helferzelle 1
T <sub>h2</sub>	T-Helferzelle 2
T <sub>h3</sub>	T-Helferzelle 3
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TU	transduzierende Einheiten ( <i>transducing units</i> )
TfrOVA	membranständiges OVA (Transferrin-OVA)
TSA	gewebsspezifische Antigene ( <i>tissue-specific antigen</i> )
Treg	regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
WPRE	posttranskriptionell regulatorisches Element des Hepatitisvirus des Waldmurmeltiers ( <i>woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element</i> )
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und Aminosäuren entsprechend ihres Einbuchstabenkodes abgekürzt. Für die Abkürzungen gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Autoimmunkrankheiten sind durch eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene charakterisiert, welche auf eine fehlende Toleranz der Lymphozyten zurückgeht und zur Zerstörung körpereigener Gewebe und Organe führt. Sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen sind an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie Typ-I-Diabetes, Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis beteiligt. Die Standardtherapie basiert auf einer unspezifischen Immunsuppression, die teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist. Im Hinblick auf eine gezielte antigenspezifische Behandlung dieser Krankheiten ist es zum einen nötig, jene Zellen zu identifizieren, welche Toleranz induzieren können. Zum anderen müssen die zugrundeliegenden Mechanismen möglichst präzise definiert werden. Während zahlreiche Studien die Funktion der Dendritischen Zelle bei der Toleranzinduktion in T-Zellen belegen, ist der Einfluss der B-Zelle in Bezug auf CD8-T-Zellen nicht geklärt und wurde daher in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurde ein Ansatz gewählt, in welchem die Rolle der B-Zelle bei der Toleranzinduktion in polyklonalen und T-Zellrezeptor transgenen CD8-T-Zellen *in vivo* untersucht werden konnte. Um eine kontinuierliche Expression des Antigens in B-Zellen zu erreichen, wurde ein retroviraler Vektor generiert, mit welchem die Transgenexpression in Knochenmarkschimären auf B-Zellen beschränkt wurde. So konnte gezeigt werden, dass CD8-T-Zellen als Folge einer selektiven Antigenexpression in B-Zellen tolerisiert werden. Detaillierte Analysen zeigten, dass die Tolerisierung nicht zentral im Thymus erfolgte sondern in der Peripherie durch die klonale und funktionelle Deletion antigenspezifischer CD8-T-Zellen. Hierbei konnten keine Unterschiede bezüglich der exprimierten Antigenform (löslich gegenüber membranständig) beobachtet werden. Nicht nur naive T-Zellen sondern auch Gedächtniszellen konnten tolerisiert werden. Ferner wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen das Antigen von B-Zellen aufnehmen, CD8-T-Zellen präsentieren und so zu deren Tolerisierung beitragen können. Dieser Mechanismus der Kreuzpräsentation schien in Abwesenheit von reifen antigenpräsentierenden B-Zellen ausreichend zu sein, um Toleranz zu induzieren. Ob antigenexprimierende B-Zellen direkt CD8-T-Zellen tolerisieren oder nur als Antigenquelle für kreuzpräsentierende tolerogene Dendritische Zellen fungieren, konnte nicht abschließend bestimmt werden. Zusammenfassend belegen die Daten, dass eine Antigenexpression in B-Zellen therapeutisch verwendet werden könnte, um den Mechanismus der Kreuzpräsentation für die Tolerisierung von CD8-T-Zellen auszunützen.

## **3 EINLEITUNG**

### **3.1 Einführung in das Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, wobei angeborene und adaptive Abwehrmechanismen unterschieden werden. Die angeborene Immunabwehr zeichnet sich durch bereits existierende Mediatoren zur sofortigen Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen aus, verfügt jedoch nur über ein limitiertes Repertoire an Rezeptoren zur Antigenerkennung. In vielen Fällen kann bereits dieses System eine Infektion verhindern. Im Gegensatz dazu besitzt das adaptive Immunsystem eine große Vielfalt von Antigenrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität. Die Effektormechanismen dieser Immunabwehr wirken nicht sofort, sondern müssen erst induziert werden und stehen daher erst einige Tage nach erfolgter Infektion zur Verfügung. Eine wichtige Eigenschaft des adaptiven Immunsystems, welches es vom angeborenen abhebt, ist die Gedächtnisfunktion. Diese gewährleistet in den meisten Fällen einen Schutz gegen wiederholte Infektionen mit demselben Pathogen. Eine zentrale Rolle bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort spielen die professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs): Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Makrophagen, welche das Antigen aufnehmen, in kurze Peptidstücke prozessieren und auf ihrer Oberfläche im Kontext von Molekülen der Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse I oder -II (*major histocompatibility complex*, MHC-I oder MHC-II) präsentieren. Das adaptive Immunsystem besitzt zwei unterschiedliche Effektormechanismen. B-Lymphozyten (B-Zellen) vertreten den humoralen Arm, um extrazelluläre Krankheitserreger und Parasiten zu eliminieren. T-Lymphozyten (T-Zellen) hingegen vermitteln den zellulären Arm zur Abwehr von intrazellulären Mikroorganismen. Beide, B-Zellen und T-Zellen, tragen an ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, mit welchen sie eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene erkennen können.

### **3.2 Die Induktion einer adaptiven Immunantwort und die Rolle der antigenpräsentierenden Zellen**

Obwohl die Pathogenität eines Mikroorganismus keine zwingende Voraussetzung für die Induktion einer Immunantwort ist, wird im Folgenden der Begriff Pathogen im Sinne von Mikroorganismus verwendet. Pathogene können auf unterschiedlichen Wegen in den Körper

eindringen und in den verschiedenen Geweben und Organen eine Infektion auslösen. Dort werden diese von professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen erkannt und aufgenommen. Die antigenpräsentierenden Zellen wandern dann in die lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz und Peyer'sche Plaques. Diese spezialisierten Organe haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, um eine effektive Begegnung der Effektorzellen des adaptiven Immunsystems mit den professionellen antigenpräsentierenden Zellen zu ermöglichen, so dass ein dem Erreger angemessener Abwehrmechanismus induziert werden kann.

### **3.2.1 Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen**

#### **3.2.1.1 Makrophagen**

Makrophagen sind große mononukleare Phagozyten, welche eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunität spielen. Bereits in der frühen Phase einer Immunabwehr nehmen sie Pathogene auf und zerstören diese. Einige dieser Pathogene haben Mechanismen entwickelt, um der Zerstörung durch Phagozyten zu entgehen. Makrophagen, in welchen Pathogene persistieren, unterstützen die adaptive Immunantwort, indem sie das Antigen in Form von MHC:Peptid-Komplexen den T-Zellen präsentieren (Debrick et al. 1991; Kovacsovics-Bankowski et al. 1993; Steinman and Cohn 1973). Makrophagen können naive CD8-T-Zellen aktivieren, sind darin im Vergleich zu Dendritischen Zellen jedoch weniger effizient (Steinman and Cohn 1973).

#### **3.2.1.2 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen kommen nahezu in allen Geweben vor, wo sie Antigen körpereigenen und pathogenen Ursprungs aufnehmen und zu den ableitenden Lymphknoten wandern, um es dort T-Zellen zu präsentieren. Sie werden als eine der wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen betrachtet, da sie sowohl naive T-Zellen aktivieren als auch tolerisieren können (Belz et al. 2002; Bonifaz et al. 2002; Hawiger et al. 2001; Inaba et al. 1990; Inaba and Steinman 1985; Levin et al. 1993). Dendritische Zellen lassen sich in mindestens sechs Subgruppen unterteilen, welche sich in ihrer Lokalisation unterscheiden (Übersichtsartikel: Heath et al. 2004). Es scheint eine große funktionelle Plastizität zwischen diesen Subgruppen zu bestehen (O'Garra and Trinchieri 2004). Gemeinsam ist ihnen die Expression des  $\alpha_{\square}$ -Integrins CD11c,  
12

welches mit dem  $\beta_2$ -Integrin CD18 den Komplementrezeptor CR4 bildet. Die im peripheren Gewebe vorkommenden unreifen Dendritischen Zellen nehmen ständig Antigen auf und prozessieren es für die Präsentation auf MHC-Molekülen. Im Vergleich zu späteren Entwicklungsstadien, ist zu diesem Zeitpunkt die Bildung und Präsentation von MHC:Peptid-Komplexen, sowie die Expression von kostimulatorischen Molekülen, die für eine effiziente T-Zellaktivierung benötigt werden, sehr niedrig. Hingegen werden Rezeptoren wie DEC-205 (Jiang et al. 1995) und Fc $\gamma$ -Rezeptor-I und -II (Fanger et al. 1996) exprimiert, mit welchen über rezeptorvermittelte Endozytose große Mengen an Antigen aufgenommen werden.

### **3.2.1.3 B-Zellen**

Da die B-Zellen in dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnehmen, soll an dieser Stelle näher auf ihre Funktion und Entwicklung eingegangen werden.

#### ***a) die Funktion der B-Zelle***

B-Zellen erkennen mit ihrem membranständigen Antikörpermolekül, dem B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR), Antigene in ihrer nativen Form. Der B-Zellrezeptor stellt eine membrangebundene Form des Antikörpers dar, welchen die B-Zelle nach ihrer Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert. Antikörper gehören zur Immunglobulin-(Ig) Superfamilie und werden in fünf Klassen unterteilt: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Sie bestehen aus zwei gepaarten schweren und zwei leichten Polypeptidketten, in denen polymorphe und konstante Regionen unterschieden werden (Übersichtsartikel: Neuberger et al. 1993). Die variablen Bereiche dienen der Antigenerkennung, so dass lösliche oder oberflächen-assoziierte Antigene wie Proteine oder Kohlenhydrate gebunden werden können. Der konstante Bereich des Antikörpermoleküls vermittelt die Effektorfunktionen, wie z.B. die Opsonisierung von Pathogenen. Bei der Opsonisierung binden Antikörper an Oberflächenstrukturen des Pathogens, was dessen Aufnahme und Eliminierung durch Phagozyten verstärkt. Ferner wird das Komplementsystem aktiviert, welches Serumproteine umfasst, die antikörpervermittelt auf dem Pathogen aktiviert werden und zu dessen Zerstörung führen. Das Komplement verstärkt wiederum die adaptive Immunantwort, insbesondere die B-Zellantwort (Übersichtsartikel: Carroll 2004). Um B-Zellen zu aktivieren, müssen diese nicht nur ihr Antigen erkennen und binden, sondern auch ein aktivierendes Signal von T-Zellen erhalten. Die B-Zelle wiederum kann Einfluss auf die Differenzierung der sie aktivierenden T-Zelle nehmen. Aktivierte B-Zellen proliferieren und differenzieren in

den so genannten Keimzentren von Lymphknoten und Milz. Hier erfolgt auch der Klassenwechsel des Antikörper-Isotyps und die Affinitätsreifung, d.h. die Änderung der Affinität des Antikörpermoleküls für das spezifische Antigen (Jacob et al. 1991). Ein Klassenwechsel, d.h. eine Änderung des konstanten Bereichs bei einer gleich bleibenden Antigenspezifität geht mit einer veränderten Effektorfunktion einher: IgM dient hauptsächlich der Komplementaktivierung; die IgG Subklassen vermitteln eine Komplementaktivierung wie auch die Phagozytose über Fc-Rezeptoren und können die Plazenta passieren; IgE führt zu einer Degranulierung von Mastzellen und IgA vermittelt die mukosale Immunität, indem es durch Epithelien transportiert werden kann.

**b) die B-Zellentwicklung**

B-Zellen entwickeln sich in einer spezialisierten Mikroumgebung, der fötalen Leber oder dem adulten Knochenmark der Wirbeltiere (Übersichtsartikel: Rolink and Melchers 1996; Rolink et al. 1999). In Maus und Mensch verläuft die B-Zellentwicklung schrittweise und in unterschiedlichen hämatopoetischen Organen, dem Knochenmark und der Milz. Die B-Zellen stammen von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark ab und differenzieren über das Pro-B- und Prä-B-Zellstadium zu unreifen und transitionalen B-Zellen. Die unreifen und transitionalen B-Zellen wandern zur Milz und entwickeln sich dort zu reifen B-Zellen (Abb. 1).

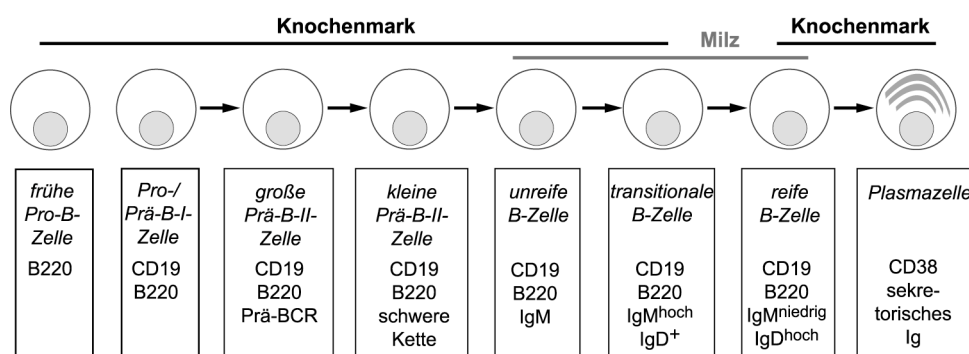


Abb. 1: Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark und in der Milz. Die B-Zellen stammen von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im Knochenmark ab und differenzieren über das Pro-B- und Prä-B-Zellstadium zu unreifen und transitionalen B-Zellen. Die unreifen und transitionalen B-Zellen wandern zur Milz und entwickeln sich dort zu reifen B-Zellen, welche durch das Blut, Gewebe, Knochenmark und die Lymphe zirkulieren. Binden reife B-Zellen mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, so werden sie aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen, die große Mengen des spezifischen Antiköpers sezernieren. Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen können anhand ihrer differentiellen Expression bestimmter Marker wie B220, CD19, IgM und IgD unterschieden werden.

Reife naive B-Zellen zirkulieren durch das Blut, Gewebe und die Lymphe und sind auch wieder im Knochenmark zu finden (Howard et al. 1972; Nieuwenhuis and Ford 1976). Binden diese mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Antigen, so werden sie aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen (Übersichtsartikel: Kunkel and Butcher 2003). Plasmazellen exprimieren keine oberflächengebundenen Antikörper mehr und sind reich an endoplasmatischem Retikulum (ER), da sie große Mengen des spezifischen Antikörpers sezernieren; zuerst vom Subtyp IgM und später nach dem Klassen-Wechsel auch vom Subtyp IgG, IgE oder IgA. B-Zellen können nach ihrer Aktivierung in peripheren Lymphknoten oder der Milz als Prä-Plasmazellen ins Knochenmark oder an mukosale Oberflächen wandern, wo sie zu Plasmazellen ausdifferenzieren (Hargreaves et al. 2001; Youngman et al. 2002). Plasmazellen aus dem Knochenmark produzieren den größten Anteil der Antikörper, welche während einer Infektion gebildet werden.

Jeder Schritt während der B-Zellentwicklung ist eng reguliert und kontrolliert durch die differentielle Expression bestimmter intrazellulärer oder membranständiger Proteine, durch die schrittweise Umordnung der für den B-Zellrezeptor kodierenden Gensegmente und durch die Interaktion der Zelle mit ihrer Mikroumgebung. Einer der frühesten Oberflächenmarker der B-Zelllinie ist CD19, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, Signaltransduktionsmolekül und Teil des B-Zell-Korezeptors. CD19 ist mit Ausnahme terminal differenzierter Plasmazellen während der gesamten B-Zellentwicklung (Abb. 1) in Mensch und Maus vom Pro-/Prä-B-Zellstadium an exprimiert (Nadler et al. 1983; Sato et al. 1997; Tedder and Isaacs 1989). Im Knochenmark der Maus exprimiert der Hauptanteil aller B-Zellvorläufer kein Immunglobulin an der Zelloberfläche, jedoch CD19 und B220 (CD45RO). Das Rearrangement des B-Zellrezeptors beginnt mit der schweren Kette in Prä-B-I-Zellen und wird in Prä-B-II-Zellen beendet. Prä-B-II-Zellen repräsentieren ca. 50 - 60% aller Prä-B-Zellen im Knochenmark (Ghia et al. 1998) und sind wie Prä-B-I-Zellen von IL-7 abhängig (Rolink et al. 1991), welches von Stromazellen produziert wird. In Prä-B-Zellen wird eine invariante leichte Kette synthetisiert, da die leichte Kette in diesem Entwicklungsstadium noch nicht rearrangiert wurde. Erfolgt die Umordnung der Gensegmente der schweren Kette im Leseraster und kann diese mit der invarianten leichten Kette paaren, so wird der Prä-B-Zellrezeptor an der Oberfläche exprimiert und die Prä-B-Zelle beginnt sich zu teilen. Man bezeichnet diese expandierenden Zellen als große Prä-B-II-Zellen. Das darauf folgende Stadium der kleinen, sich nicht mehr teilenden Prä-B-II-Zellen ist durch die fehlende Expression des Prä-B-Zellrezeptors an der Zelloberfläche charakterisiert (Karasuyama et al. 1994; Rolink et al. 1994). Diese Zellen haben bereits ihre leichte Kette rearrangiert.

Täglich verlassen ca.  $20 \times 10^6$  unreife B-Zellen, welche den B-Zellrezeptor (IgM) an der Oberfläche exprimieren, das Knochenmark über den Blutstrom (Hardy et al. 1991). Diese B-Zellen wandern zur Milz und werden als transitionale Zellen bezeichnet, welche zusätzlich zu IgM auch IgD exprimieren, kurzlebig und funktionell unreif sind. Da diese eine durchschnittliche Lebenszeit von drei bis vier Tagen besitzen, gehen 90 – 95% dieser Zellen in der Milz verloren. Aus bis heute mechanistisch noch nicht vollständig verstandenen Gründen werden nur fünf bis zehn Prozent dieser Zellen als reife B-Zellen mit einer Lebenszeit von etwa 15 Wochen selektiert (Forster and Rajewsky 1990).

Während ihrer Entwicklung wird die B-Zelle zwei Selektionsprozessen unterzogen. Der erste findet in Prä-B-II-Zellen statt und gewährleistet, dass nur jene Zellen expandieren und die leichte Kette rearrangieren, welche eine produktive Umordnung der schweren Kette im Leseraster haben und folglich einen Prä-B-Zellrezeptor exprimieren können. Der zweite Selektionsprozess findet in unreifen und transitionalen B-Zellen statt. Da durch die somatische Rekombination der für die schwere und leichte Kette kodierenden Gensegmente eine Vielfalt von unterschiedlichen B-Zellrezeptoren entsteht, müssen diese auf ihre Autoreaktivität (negative Selektion) überprüft werden. Daher werden autoreaktive B-Zellen bereits im Knochenmark klonal deletiert (Hartley et al. 1991; Murakami et al. 1992; Nemazee and Burki 1989). Alternativ können diese ihren B-Zellrezeptor editieren (Radic et al. 1993; Tiegs et al. 1993), mit dem Ziel ein nicht autoreaktives Rezeptormolekül zu generieren. Des Weiteren können autoreaktive B-Zellen anergisiert werden (Erikson et al. 1991; Goodnow et al. 1988). Aufgrund einer nicht funktionellen (positive Selektion) oder autoreaktiven (negative Selektion) B-Zellrezeptors sterben 70% aller täglich produzierten Prä-B-Zellen durch Apoptose (Deenen et al. 1990; Melchers et al. 1993; Osmond 1993). Doch auch nach Verlassen des Knochenmarks können autoreaktive B-Zellen noch tolerisiert werden. Wird während der Differenzierung von der transitionalen zur reifen B-Zelle in der Milz der B-Zellrezeptor kreuzvernetzt, so wird die Zelle deletiert (Carsetti et al. 1995; Norvell and Monroe 1996).

Nach dem soeben beschriebenen Schema entwickeln sich B-2-B-Zellen, welche zusammen mit den T-Zellen die zwei Hauptpfeiler der adaptiven Immunantwort bilden. In der Milz, im Peritoneum und Pleuraraum findet sich neben den B-2-B-Zellen eine weitere B-Zellpopulation, die B-1-B-Zellen, welche aus der fötalen Leber hervorgehen und die adulte Milz zu ihrer Generierung oder zum Überleben benötigen (Hardy 1992; Hayakawa et al. 1985). Im Gegensatz zu B-2-B-Zellen produzieren diese so genannte natürliche Antikörper, d.h. Antikörper welche maßgeblich vom Subtyp IgM sind, mehrere Antigene mit niedriger



Affinität erkennen und damit die erste Verteidigungslinie bei einer Infektion darstellen, bevor die humorale Antwort nach etwa einer Woche greift.

### 3.3 Die Funktion und Entwicklung der T-Zellen

T-Zellen tragen den T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR), welcher nur Antigene erkennt, wenn diese von antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und im Kontext von MHC-I oder MHC-II präsentiert werden. Der T-Zellrezeptor ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Analog zu diesen  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zellen existieren zu einem kleinen Prozentsatz auch  $\gamma$ : $\delta$ -T-Zellen, auf die hier aber nicht eingegangen werden soll.  $\alpha$ : $\beta$ -T-Zellen lassen sich in CD4- und CD8-T-Zellen einteilen, welche unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

#### 3.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

MHC-Moleküle sind polymorphe Membranglykoproteine, die in der Maus auf Chromosom 17 kodiert sind und H-2 genannt werden. Für MHC-I-Moleküle kodieren in der Maus insgesamt drei Gene (H-2K, D, L), für MHC-II nur zwei (H-2IA und H-2IE). Der hohe Polymorphismus wird durch unterschiedliche Allele für einzelne MHC-Loci erreicht, so dass jedes Individuum einen bestimmten MHC-Haplotyp besitzt. So wird gewährleistet, dass auf Populationsebene unterschiedliche antigene Strukturen von ein und dem selbem Pathogen präsentiert werden und dieses sich nicht weiter ausbreiten kann.

MHC-I-Moleküle setzen sich aus einer schweren membranständigen  $\alpha$ -Kette und dem nicht kovalent gebundenen Polypeptid  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) zusammen. Der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Kette wird in drei Domänen unterteilt, wobei die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domäne eine Tasche formen, welche die Bindung von Peptiden mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren erlaubt. MHC-I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers zu finden. Dadurch ist gewährleistet, dass infizierte Zellen von CD8-T-Zellen erkannt und eliminiert werden können. Generell werden auf MHC-I Peptide präsentiert, die von endogen synthetisierten Proteinen abstammen d.h. körpereigenen (Autoantigene) wie auch viralen oder bakteriellen Ursprungs sein können. Die im Zytosol vorliegenden Antigene werden proteolytisch im Proteasom in kleine Peptide gespalten und über einen ATP-abhängigen Transporter ins ER transloziert. Dort werden sie auf MHC-I-Moleküle geladen und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden.

MHC-II-Moleküle bestehen aus zwei membranständigen Ketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ), welche sich in jeweils zwei Domänen unterteilen lassen. Die  $\alpha$ 1- und  $\beta$ 1-Domäne bilden die Bindungstasche in welcher Peptide bis zu 30 Aminosäuren oder länger gebunden werden können. Im Gegensatz zu endogenen Antigenen, werden exogene Antigene auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Das exogene Antigen wird internalisiert und proteolytisch in Endosomen/Lysosomen gespalten. Die Bildung von MHC-II:Peptid-Komplexen erfolgt, indem die vom endoplasmatischen Retikulum stammenden Vesikel, welche MHC-II-Moleküle enthalten, mit den Endosomen/Lysosomen fusionieren.

Neben diesen klassischen MHC-Molekülen gibt es nicht polymorphe MHC-I und -II Moleküle, auf die hier jedoch nicht weiter eingegangen wird.

### **3.3.2 Die Funktion, Aktivierung und Differenzierung von CD8-T-Zellen**

CD8-T-Zellen sind essentiell für die Eliminierung von viralen Infektionen und intrazellulär replizierenden Bakterien. Diese Zellen exprimieren das CD8-Molekül, das als Korezeptor für den T-Zellrezeptor dient. Sie erkennen ihr Antigen nur im Kontext von MHC-I-Molekülen (Zinkernagel and Doherty 1974) und werden aktiviert, wenn sie über MHC-I:Peptid-Komplexe (Signal 1) und kostimulatorische Moleküle auf der antigenpräsentierenden Zelle wie B7.1 und B7.2 (Signal 2) stimuliert werden. T-Zellen binden B7.1 und B7.2 über das CD28-Molekül. Ferner wird ein drittes Signal in Form von IL-12 benötigt, welches von Dendritischen Zellen sezerniert wird, um eine starke Expansion und Effektorfunktion der T-Zellen zu erhalten. Fehlt das dritte Signal, führt die Antigenstimulation zur Toleranzinduktion in der T-Zelle (Curtsinger et al. 2003; Hernandez et al. 2002). Eine Studie, welche die Interaktion *in vitro* von Dendritischen Zellen und CD8-T-Zellen unter tolerogenen und inflammatorischen Bedingungen mittels 2-Photonen Mikroskopie untersuchte, konnte zeigen, dass unter tolerogenen Bedingungen im Gegensatz zu immunstimulatorischen, keine stabilen und lang anhaltenden Kontakte (< 6 Stunden) zwischen diesen Zellen etabliert werden. Der Zeitpunkt und die Dauer der stabilen Interaktion schien dabei vom Aktivierungs- und Differenzierungsstatus der Dendritischen Zelle abzuhängen (Hugues et al. 2004).

Manche Pathogene infizieren nicht direkt Dendritische Zellen (Mueller et al. 2002), wiederum andere infizieren diese, beeinträchtigen jedoch deren Funktion (Gredmark and Soderberg-Naucler 2003). Folglich müssen Mechanismen existieren, welche eine antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen durch primär nicht infizierte Dendritische Zellen gewährleisten. Dendritische Zellen können exogenes Antigen von infizierten oder tumorigenen Zellen über

die Phagozytose (Ackerman et al. 2003; Guermonprez et al. 2003) und das „Abknabbern“ (*nibbling*) des Antigens von lebenden Zellen (Harshyne et al. 2001; Harshyne et al. 2003) aufnehmen. Weiterhin wurde die Aufnahme von Exosomen (Wolfers et al. 2001; Zitvogel et al. 1998), apoptotischem Material (Albert et al. 1998; Arrode et al. 2000; Ferguson et al. 2002) und Hitzeschockproteinen (Srivastava 2002) beschrieben. Die auf diesen Wegen aufgenommenen Antigene können über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus im Kontext von MHC-I präsentiert werden. Dieses Phänomen der Kreuzpräsentation (*cross-presentation*) wurde zuerst von Michael Bevan im Jahr 1976 beschrieben (Bevan 1976). Im Gegensatz zu B-Zellen und Endothelzellen ist die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation *in vivo* für Dendritische Zellen und Makrophagen (Debrick et al. 1991; Levin et al. 1993) gesichert, obwohl Dendritische Zellen im Vergleich zu Makrophagen exogenes und insbesondere lösliches Antigen wesentlich effizienter kreuzpräsentieren (Ackerman et al. 2005). Analog zu Dendritischen Zellen (Albert et al. 1998) nehmen Makrophagen (Bellone et al. 1997) apoptotisches Material auf und kreuzpräsentieren dies. Im Gegensatz zur Kreuzpräsentation des Antigens durch Dendritische Zellen führt dies jedoch nicht zu einer Aktivierung von naiven CD8-T-Zellen (Ronchetti et al. 1999). Die CD8-positiven Dendritischen Zellen scheinen die einzigen Zellen zu sein, welche konstitutiv kreuzpräsentieren können, wogegen dieser Mechanismus in CD8-negativen Dendritischen Zellen wohl aktivierungsabhängig ist (den Haan and Bevan 2002).

Naive CD8-T-Zellen können sich alle vier bis acht Stunden und bis zu 15 mal teilen. So können innerhalb von sieben Tagen nach Aktivierung  $10^4$  Tochterzellen einer einzigen antigenspezifischen CD8-T-Zelle generiert werden (Butz and Bevan 1998; Callan et al. 1998; Doherty 1998). Es werden sowohl Effektorzellen als auch Gedächtniszellen gebildet. Obwohl CD4-T-Zellen nicht zwangsläufig für die Induktion einer primären CD8-T-Zellantwort gegen Pathogene benötigt werden, beeinflussen sie die Gedächtnisantwort (Janssen et al. 2003; Shedlock and Shen 2003; Sun et al. 2004). Persistiert das Antigen, gehen die antigenspezifischen CD8-T-Zellen in Abhängigkeit der Antigenkonzentration schnell oder langsam verloren und es kann keine robuste Gedächtnisantwort etabliert werden (Kaech et al. 2002; Wherry et al. 2003). Auch B-Zellen scheinen einen Einfluss auf die Etablierung der Gedächtnisantwort auszuüben (Shen et al. 2003).

Im Vergleich zu naiven T-Zellen, sind Effektor- und Gedächtniszellen weniger abhängig von der Gegenwart kostimulatorischer Signale und benötigen weniger Antigen um aktiviert zu werden (Übersichtsartikel: Gourley et al. 2004). Zytotoxische Effektorzellen wandern zum Ort der Infektion, erkennen und töten Zellen, die den entsprechenden Antigen:MHC-I-

Komplex präsentieren. Innerhalb weniger Minuten, in denen eine zytotoxische T-Zelle ihre Zielzelle erkennt, wird in dieser der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert, welcher sich in den folgenden zwei bis sechs Stunden vollzieht. Zu den zytotoxischen Mediatoren der CD8-Effektorzellen zählt die Expression des Oberflächenmoleküls Fas-Ligand sowie die zytoplasmatischen, membran-assoziierten Granula, welche Effektorsubstanzen wie Perforin und Granzym B enthalten. Ferner sezernieren diese Zellen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$ . IFN- $\gamma$  hemmt die virale Replikation, erhöht die Expression von MHC-I auf infizierten Zellen und aktiviert analog zu TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  Makrophagen. TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  können auch direkt über den TNF-Rezeptor-I Apoptose in den Zielzellen induzieren (Übersichtsartikel: Dempsey et al. 2003).

Neben den zytotoxischen T-Zellen scheinen auch regulatorische CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup>Qa-1<sup>+</sup> T-Zellen zu existieren, doch ihr Ursprung, ihre Generierung und Induktion ist noch relativ undefiniert (Übersichtsartikel: Jiang and Chess 2004).

### **3.3.3 Die Funktion, Aktivierung und Differenzierung von CD4-T-Zellen**

CD4-T-Zellen exprimieren das CD4-Molekül, welches als Korezeptor für den T-Zellrezeptor dient und erkennen ihr Antigen nur im Kontext von MHC-II (Rosenthal and Shevach 1973).

Um eine angemessene Immunantwort zu gewährleisten, differenzieren naive CD4-T-Zellen in unterschiedliche Effektorzellen wie T-Helferzellen oder auch regulatorische T-Zellen (T<sub>r</sub>). T-Helferzellen beeinflussen sowohl den zellulären als auch humoralen Arm der Immunantwort, indem sie die Proliferation und Differenzierung von anderen T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Leukozyten anregen. Die am besten charakterisierten Reihen sind die T-Helferzellen-1 (T<sub>h1</sub>) und T-Helferzellen-2 (T<sub>h2</sub>). T<sub>h1</sub>-Zellen produzieren Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\beta$ , welche Phagozyten und NK-Zellen aktivieren, gleichzeitig die T<sub>h2</sub>-Differenzierung inhibieren und die Produktion von opsonisierenden Antikörpern stimulieren, wodurch sie eine zentrale Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen einnehmen (Abbas et al. 1996). T<sub>h2</sub>-Zellen hingegen sezernieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 (Mosmann and Coffman 1989). Diese nehmen auf die Aktivierung von B-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen Einfluss, führen zur Produktion von opsonisierenden IgG<sub>1</sub>- sowie IgE-Antikörpern und sind daher wichtig für die Eliminierung von Parasiten (Abbas et al. 1996). Unter bestimmten Bedingungen können auch regulatorische T<sub>h3</sub><sup>-</sup> oder T<sub>r1</sub>-Zellen induziert werden, welche die Proliferation naiver CD4-T-Zellen supprimieren (Übersichtsartikel: Fehervari and Sakaguchi 2004). So kann eine chronische Inflammation und Zerstörung des

Gewebes verhindert und die Induktion einer starken Gedächtnisantwort durch die verzögerte Eliminierung des Pathogens induziert werden (Belkaid et al. 2002; Montagnoli et al. 2002). Die Differenzierung der naiven CD4-T-Zelle wird durch drei Signale determiniert, welche diese von der antigenpräsentierenden Zelle erhält. Signal eins und zwei erfolgen in Form des MHC-II:Peptid-Komplexes (Rosenthal and Shevach 1973) und kostimulatorischer Moleküle (Cunningham and Lafferty 1977). Das dritte Signal umfasst Faktoren, welche die Polarisierung der T-Zelle beeinflussen.

### 3.3.4 Die T-Zellentwicklung

B-Zellen und T-Zellen stammen von einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle aus dem Knochenmark ab. Im Gegensatz zu B-Zellen, die sich im Knochenmark und der Milz entwickeln, verläuft die weitere Entwicklung der T-Zellen im Thymus (Anderson et al. 1996; Boyd and Hugo 1991). Die Entwicklung der T-Zelle hängt von hämatopoetischen und insbesondere nicht hämatopoetischen Zellen ab, welche sich in zwei unterschiedlichen anatomischen Bereichen des Thymus befinden, dem Kortex (Rinde) und der Medulla (Mark). Daher müssen die Thymozyten zwischen diesen Zonen wandern, um die nötigen Signale für ihre weitere Entwicklung zu erhalten. Die ersten den Thymus besiedelnden T-Zellen sind die doppelt negativen ( $CD3^-CD4^-CD8^-$ ) Thymozyten, welche an der kortiko-medullaren Grenze (Lind et al. 2001) in den Thymus gelangen. Diese wandern über die subkapsuläre Region durch den Kortex und differenzieren durch den Einfluss des thymischen Stromas zu doppelt positiven ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) Thymozyten. Diese entwickeln sich weiter zu einfach positiven Thymozyten, welche entweder die Expression von CD8 oder CD4 verloren haben und MHC-I- oder MHC-II-restringiert sind. Einfach positive Thymozyten befinden sich in der Medulla, verlassen dort über den Blutstrom den Thymus, zirkulieren wie B-Zellen durch das Blut, die Lymphe und sekundären lymphatischen Organe oder befinden sich in nicht lymphatischen Organen (Übersichtsartikel: Walker and Abbas 2002), bis sie durch ihr kognates Antigen aktiviert werden.

Analog zu B-Zellen entsteht die Vielfalt des T-Zellrezeptors durch die somatische Rekombination limitierter, vererbter Gensegmente. Doppelt positive Zellen haben bereits die Gene für die T-Zellrezeptor  $\beta$ -Kette rearrangiert und proliferieren, wenn sie den Prä-T-Zellrezeptor (von Boehmer and Fehling 1997) exprimieren, welcher aus der  $\beta$ -Kette und einer invarianten  $\alpha$ -Kette besteht. Im darauf folgenden Stadium der kleinen, sich nicht mehr teilenden doppelt positiven Zellen werden auch die Gene der  $\alpha$ -Kette rearrangiert.

Thymozyten, welche einen  $\alpha:\beta$ -T-Zellrezeptor exprimieren, scheinen innerhalb eines relativ großen Entwicklungsfensters für die rezeptorvermittelte Induktion des Zelltods empfänglich zu sein: angefangen von den unreifen doppelt positiven Thymozyten im Kortex bis hin zu den reifen einfach positiven Thymozyten in der Medulla. Doppelt positive Thymozyten werden einem zweistufigen Selektionsprozess unterzogen. 95% aller Thymozyten sterben während der positiven Selektion durch Apoptose, da ihr T-Zellrezeptor nicht mit den organismuseigenen MHC-Molekülen interagieren kann. Doppelt positive Thymozyten haben eine beschränkte Lebensdauer von drei bis vier Tagen, in denen sie jedoch so lange die Gene für die  $\alpha$ -Kette rearrangieren können, bis eine  $\alpha$ -Kette entsteht, welche nicht nur produktiv ist, sondern auch in Kombination mit der  $\beta$ -Kette körpereigene MHC-Moleküle erkennen kann (Borgulya et al. 1992; Brandle et al. 1992). Des Weiteren werden positiv selektionierte T-Zellen im Rahmen der negativen Selektion auf ihre Autoreaktivität getestet. Thymozyten, welche beide Selektionsprozesse erfolgreich bestehen, entwickeln sich zu einfach positiven CD4- oder CD8 -Thymozyten.

Kortikale Epithelzellen (*cortical thymic epithelial cells*, cTECs) im Thymus sind essentiell für die positive Selektion. Dieser Selektionsschritt scheint durch Peptide vermittelt zu sein, welche eine niedrigere Affinität (Bindungsstärke) oder Avidität (Summe der Bindungsstärke) als die antagonistischen Liganden besitzen, welche eine T-Zellaktivierung oder die negative Selektion induzieren (Ashton-Rickardt et al. 1994; Hogquist et al. 1995; Stefanski et al. 2001). Die Anzahl und Natur der Peptide sowie ihre strukturelle Verwandtschaft zu antagonistischen Peptiden, wird noch immer kontrovers diskutiert.

### **3.4 Die Toleranzinduktion in T-Zellen**

Angesichts der potenten Effektormechanismen von T-Zellen, müssen Mechanismen zur Toleranzinduktion existieren, um körpereigene, nicht infizierte Zellen zu schützen.

#### **3.4.1 Grundlagen der Toleranzinduktion**

Im Laufe der Evolution erfuhr das Immunsystem eine fortlaufende Spezialisierung: angefangen bei den Invertebraten, welche schon ein angeborenes Immunsystem in Form von löslichen antimikrobiellen Molekülen besitzen, bis über die ersten Antikörper und Lymphozyten der Gnathostomata (Kiefernfünder) zu den heute hoch differenzierten und

spezialisierten Formen des adaptiven Immunsystems der Säugetiere. Die Antigenrezeptoren der T-Zellen und B-Zellen können eine große Diversität an Antigenen spezifisch erkennen. Ein Individuum kann schätzungsweise zwischen  $10^7$  und  $10^9$  unterschiedlichen antigenen Determinanten differenzieren. Dies wird durch die kombinatorische Vielfalt der Gensegmente erreicht, welche für die Antigenrezeptoren kodierenden, sowie durch das zufällige Einfügen von Nukleotiden an den Verbindungen der einzelnen Segmente. Das dadurch theoretisch mögliche Repertoire umfasst für B-Zellen ca.  $10^{11}$  und für T-Zellen  $10^{16}$  mögliche spezifische Rezeptoren. Dieses Rezeptor-Repertoire kann jedoch nicht nur pathogene sondern auch körpereigene Antigene erkennen. Daher ist es für die Regulation des Immunsystems essentiell, dass der T-Zellrezeptor auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit MHC-Molekülen (positive Selektion) und auf die Erkennung von Autoantigenen (negative Selektion) überprüft wird. So kann Toleranz gegen körpereigene Antigene sichergestellt werden. Dieser Mechanismus bietet jedoch keine absolute Sicherheit und ein Versagen der Selbst-Toleranz manifestiert sich in Form von Autoimmunkrankheiten (5% der Nord-Amerikaner und Europäer, davon 2/3 Frauen; Steinman 1993), was der Preis für die hohe Antigen-Diversität zu sein scheint.

Der T-Zelltoleranz liegen wenigstens zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde: die zentrale Toleranz, welche auf sich entwickelnde, unreife T-Zellen (Thymozyten) im Thymus wirkt und die periphere Toleranz, welche reife T-Zellen toleriert, die den Thymus bereits verlassen haben. Die Bedeutung der zentralen gegenüber der peripheren Toleranz für die effektive, vollständige Eliminierung autoreaktiver T-Zellen und damit für die Erhaltung der körpereigenen Toleranz, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Da jedoch in gesunden Individuen periphere Lymphozyten mit einem Rezeptor für Autoantigene gefunden wurden (Bouneaud et al. 2000; Liblau et al. 1991; Lohmann et al. 1996; Semana et al. 1999) muss davon ausgegangen werden, dass die periphere Toleranz einen zusätzlichen Mechanismus zur zentralen Toleranzinduktion darstellt. Additive, synergistische oder redundante Toleranzmechanismen erscheinen im Hinblick auf die Auswirkungen einer Autoimmunerkrankung sinnvoll, welche unweigerlich zur Zerstörung des Organismus führen.

## 3.4.2 Die zentrale Toleranzinduktion

### 3.4.2.1 Die negative Selektion

Während die Liganden für die positive Selektion im allgemeinen nicht stimulatorischer Natur sind, werden Thymozyten, welche stimulatorische Liganden mit einer zu hohen Affinität oder Avidität erkennen, im Thymus klonal deletiert. Dieses Ereignis wird unter dem Begriff der negativen Selektion zusammengefasst, welche die Toleranz des entstehenden T-Zellrepertoires gegenüber körpereigenen Antigenen sicherstellt. Die negative Selektion findet an der kortiko-medullaren Grenzregion und in der Medulla selbst statt. Toleranz wird durch die klonale Deletion, Inaktivierung (Anergisierung) autoreaktiver Thymozyten und Induktion regulatorischer T-Zellen induziert (Annacker et al. 2001; Lanoue et al. 1997; Mamalaki et al. 1996; Palmer 2003; Venanzi et al. 2004).

Die entsprechenden Antigene, gegen welche Toleranz induziert wird, können von unterschiedlichen Zellarten synthetisiert und den Thymozyten präsentiert werden. Diese Funktion wurde Stromazellen des Thymus, sowie auch Zellen hämatopoetischen Ursprungs zugeschrieben. Die Expression von gewebsspezifischen Antigenen (*tissue-specific antigens*, TSAs) auf epithelialen Zellen in der Thymusmedulla (*medullary thymic epithelial cells*, mTECs) scheint dabei essentiell zu sein (Derbinski et al. 2001; Gotter et al. 2004; Smith et al. 1997). Die Expression der TSAs hängt von *AIRE* (*autoimmune regulator*) ab, welches vermutlich ein Transkriptionsfaktor ist und vor allem im Thymus vorkommt. Die stärkste *AIRE*-Expression im Thymus zeigen mTECs, gefolgt von Dendritischen Zellen. Die zentrale Rolle dieses Moleküls ist am Auftreten einer Autoimmunkrankheit in Patienten mit einer *AIRE*-Defizienz zu ermessen, welche mehrere Organe betrifft (Vogel et al. 2002). Unklar ist jedoch, wie eine effiziente negative Selektion autoreaktiver Thymozyten garantiert werden kann, wenn nur etwa 1 - 5% aller mTECs TSAs exprimieren (Avichezer et al. 2003; Derbinski et al. 2001; Gotter et al. 2004; Klein et al. 2001). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen TSAs aufnehmen, kreuzpräsentieren und so die Zahl der TSA-präsentierenden Zellen erhöhen können (Gallegos and Bevan 2004). Andererseits können vollständig reife Thymozyten, welche eine hohe Motilität (Bousso et al. 2002) besitzen, bis zu zwei Wochen (Rooke et al. 1997; Scollay and Godfrey 1995) in der Medulla verbringen. Somit hätten diese die Zeit und Möglichkeit, mit den wenigen TSA-exprimierenden mTECs zu interagieren. Ob mTECs die einzigen TSA-exprimierenden Zellen sind, wird kontrovers diskutiert, da die Expression mancher Antigene auch in Dendritischen Zellen und Makrophagen des Thymus nachgewiesen wurde (Pugliese et al. 2001; Throsby et



al. 1998). Für B-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese ausreichend sind, um superantigenbindende CD4-T-Zellen, jedoch nicht CD8-T-Zellen, klonal im Thymus zu deletieren (Kleindienst et al. 2000).

### **3.4.2.2 Anergisierung und regulatorische T-Zellen**

Autoreaktive T-Zellen in der Peripherie tragen meist einen niedrig affinen T-Zellrezeptor (Bouneaud et al. 2000). Diese Zellen scheinen anergisch zu sein und üben möglicherweise eine regulatorische Funktion aus. Während die Interaktion mit agonistischen Peptiden im Thymus zur klonalen Deletion der meisten  $\alpha:\beta$ -T-Zellen führt, wurde eine Population von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen (Übersichtsartikel:Fehervari and Sakaguchi 2004),  $CD8\alpha\alpha^+$  T-Zellen (Yamagata et al. 2004) und NKT-Zellen (Benlagha et al. 2002) beschrieben, welche eben diese Interaktion zu ihrer Differenzierung benötigt. Diese Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp und üben eine dominante regulatorische Funktion aus. Die Deletion von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen ist mit dem Auftreten von verschiedenen Autoimmunkrankheiten assoziiert (Asano et al. 1996). Diese Zellen supprimieren in einer antigenunspezifischen und vom Zell/Zell-Kontakt abhängigen Weise die Proliferation anderer T-Zellen. Momentan ist unklar, ob diese regulatorischen Zellpopulationen eigenständige Reihen repräsentieren oder eher einen bestimmten Aktivierungsstatus als Folge des Ansprechens auf agonistische Peptide. Weiterhin ist ungeklärt, warum diese Zellen nicht aus dem Repertoire deletiert wurden. Die Avidität als Funktion der Antigenkonzentration, Dichte der MHC:Peptid-Komplexe und Affinität des T-Zellrezeptors scheint hierbei eine Rolle zu spielen (Jordan et al. 2000; Yamagata et al. 2004).

### **3.4.3 Periphere Toleranzinduktion**

Es gibt gewebs- und organspezifische Antigene (periphere Antigene), welche im Thymus nicht präsentiert werden und gegen welche folglich nicht negativ selektioniert werden kann. Des weiteren werden Thymozyten, welche ihr entsprechendes Antigen nur mit niedriger Affinität erkennen, im Thymus nicht klonal deletiert. Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen werden durch intrinsische (Ignoranz, Anergie, Deviation und Deletion) und extrinsische (tolerogene Dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen) Mechanismen toleriert.

### 3.4.3.1 Intrinsische Mechanismen

#### a) *Klonale Ignoranz*

Ein wichtiger Mechanismus, um die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie zu verhindern, ist die klonale Ignoranz. Dies bedeutet, dass T-Zellen zu ihrem kognaten Antigen unter nicht inflammatorischen Bedingungen keinen Zugang (Alferink et al. 1998; Zinkernagel 1996) haben, weil diese z.B. nicht in das Gewebe einwandern. Andererseits kann auch die Antigenmenge für eine T-Zellaktivierung zu niedrig sein (Kurts et al. 1998). Kommt es allerdings zu einer Verletzung oder Störung der Gewebsstruktur, kann dies zu einer Aktivierung und folglich einer Autoimmunkrankheit führen.

#### b) *Anergie*

Anergie wurde zuerst *in vitro* als Folge einer Stimulierung des T-Zellrezeptors in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen beschrieben (Jenkins and Schwartz 1987). Spätere Arbeiten zeigten jedoch, dass inhibitorische Moleküle wie CTLA-4 (ein CD28-Homolog mit inhibitorischer Funktion, welches auf T-Zellen exprimiert ist) die Anergisierung autoreaktiver T-Zellen *in vivo* beeinflusst (Perez et al. 1997; Walunas and Bluestone 1998). Ferner scheint auch das PD-1 Molekül eine Rolle zu spielen, welches stark auf anergischen T-Zellen exprimiert ist (Lechner et al. 2001) und in PD-1 defizienten Mäusen zu Autoimmunkrankheiten führt. Es scheint die Sezernierung von Zytokinen zu inhibieren und einen Zellzyklusarrest zu induzieren (Freeman et al. 2000; Latchman et al. 2001; Nishimura et al. 1999).

Anergie in T-Zellen lässt sich prinzipiell in zwei Kategorien einteilen, in die klonale Toleranz und die adaptive Toleranz (auch *in vivo* Anergie genannt). Die klonale Toleranz (Übersichtsartikel: Lechler et al. 2001) ist die Folge einer unvollständigen T-Zellaktivierung und tritt meist in kürzlich aktivierten T-Zellen auf. Dieser Status ist charakterisiert durch eine Inhibierung der proliferativen Kapazität, jedoch nicht der Effektorfunktion, d.h. der Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-10 oder IL-4. Durch IL-2 (Essery et al. 1988) oder Stimulation über Ox40 (Bansal-Pakala et al. 2001) kann die klonale Toleranz rückgängig gemacht werden. Die adaptive Toleranz wird meist in naiven T-Zellen durch eine Stimulation in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen induziert. Dabei behalten die Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung in unterschiedlichem Maße bei und regulieren diese bei persistierendem Antigen herunter (Pape et al. 1998; Rocha and von Boehmer 1991). Sie sezernieren keine Effektorzytokine und scheinen eine Blockierung in der Signaltransduktion des IL-2 Rezeptors aufzuweisen. Die adaptive Toleranz kann nicht durch IL-2 (Lanoue et al.

1997) rückgängig gemacht werden, in CD4-T-Zellen jedoch durch Stimulation über Ox40 (Rogers et al. 2001).

### ***c) Deviation***

Auch wenn eine T-Zelle aktiviert wird, kann Toleranz gewahrt werden, indem die aktivierte T-Zelle ein Zytokin- und Chemokinprofil sezerniert, welches keine pathogenen Effekte auslöst. Die Gegenwart von T<sub>h2</sub>-Zytokinen wurde mit einer Verbesserung des Krankheitsbilds beim autoimmunen Diabetes (Bradley et al. 1999) und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE; Young et al. 2000) assoziiert. Ferner bestimmt das Migrationsmuster der Lymphozyten, mit welchen akzessorischen Zellen die T-Zelle interagiert (Ishikawa et al. 2001; Kearney, 1994 #505).

### ***d) Deletion***

Der wahrscheinlich sicherste Weg, um die Zerstörung körpereigenen Gewebes zu verhindern, ist die Eliminierung autoreaktiver Klone in der Peripherie durch den aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD). Speziell CD4-T-Zellen sind für den AICD über die Ligandation des Fas-Rezeptors (Suda et al. 1993) empfänglich und gewisse Autoimmunkrankheiten sind mit einem Defekt in Fas oder FasL assoziiert (Watanabe-Fukunaga et al. 1992). Ferner scheint der Fas-induzierte AICD von IL-2 abzuhängen (Van Parijs et al. 1997). Die periphere Deletion autoreaktiver T-Zellen ist in den meisten experimentellen Modellen nicht vollständig, wobei die verbliebenen Zellen anergisch sind. Möglicherweise dient die klonale Deletion nur zur Reduzierung der Frequenz autoreaktiver T-Zellen, um diese effektiv anergisieren zu können.

## **3.4.3.2 Extrinsische Mechanismen**

### ***a) Regulatorische Dendritische Zellen***

Eine der zentralen Fragen jüngster Zeit ist die Identität der antigenpräsentierenden Zelle, welche Toleranz gegenüber Immunität induziert. Dendritischen Zellen wurde in beiden Prozessen eine zentrale Rolle eingeräumt. Noch ungeklärt ist, ob unreife Dendritische Zellen die tolerogenen Funktionen ausüben, oder ob dies eine bestimmte Subpopulation übernimmt. Eine Hypothese lautet (Janeway 1992), dass Dendritische Zellen über ihre Rezeptoren zur Erkennung von mikrobiellen Mustern (*pattern-recognition receptors*, PRRs) körperfremde von körpereigenen Antigenen unterscheiden und so entweder tolerogen oder

immunstimulatorisch wirken können. Die ständig wachsende Liste an Liganden, welche die PRRs oder TNF-Rezeptoren stimulieren sowie funktionelle Daten aus knock-out-Mäusen, sprechen für diese Hypothese. Ein alternativer Ansatz (Matzinger 1994; Matzinger 1998) schlägt vor, dass Immunität nur in Zusammenhang mit einer Zerstörung körpereigener Zellen induziert wird, welche z.B. mit der Freisetzung von Hitzeschockproteinen oder mitochondrialen Produkten einhergeht. Dies würde auch erklären, weshalb Nekrose mit Immunität und Apoptose mit Toleranz assoziiert ist (Basu et al. 2000).

### ***b) Regulatorische T-Zellen***

Es werden zwei Arten von regulatorischen T-Zellen unterschieden: natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, welche ständig im Thymus produziert werden und bereits besprochen wurden, und jene, die aufgrund von tolerogenen Interaktionen in der Peripherie entstehen.

In der Peripherie wurden zahlreiche unterschiedliche Arten an regulatorischen Zellen (Übersichtsartikel: Jiang and Chess 2004) beschrieben, die anhand ihrer Induktion und Funktion in drei Gruppen unterteilt werden können:

1) NKT-Zellen vermitteln während einer Immunantwort eine frühe Suppression durch die IFN- $\gamma$ -induzierte Zytotoxizität und Sezernierung von IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  (Gombert et al. 1996; Sharif et al. 2002).

2) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Zellen supprimieren bereits in der frühen Phase einer primären Antwort. Erstere vermitteln ihre Effekte über Zytokine, letztere indem sie regulatorische Dendritische Zellen induzieren, welche ILT3 und ILT4 (*inhibitory Ig-like transcript*, ILT) exprimieren (Chang et al. 2002; Najafian et al. 2003). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren über den direkten Zell/Zell-Kontakt, aber auch über die Sezernierung von Zytokinen.

3) Qa-1-restringierte CD8-T-Zellen stellen die dritte Gruppe dar (Jiang et al. 1992). Die regulatorische Wirkung dieser Zellen ist auf die sekundäre Immunantwort beschränkt, da sie zuerst durch aktivierte CD4-T-Zellen während einer Primärantwort induziert werden müssen.

### **3.4.4 Die Rolle der B-Zelle bei der Toleranzinduktion in T-Zellen**

Während Dendritische Zellen je nach Aktivierungsstatus bzw. Gegenwart von entzündlichen Signalen sowohl Toleranz als Immunität induzieren können (Übersichtsartikel: Moser 2003), wird die Funktion der B-Zelle als professionelle antigenpräsentierende Zelle und damit ihre

Rolle bei der Induktion und Regulation einer Immunantwort noch immer kontrovers diskutiert. Allgemein hin wird angenommen, dass B-Zellen im Vergleich zu Dendritischen Zellen eine weniger potente Klasse professioneller antigenpräsentierender Zellen im Bezug auf die Aktivierung naiver T-Zellen darstellen (Inaba and Steinman 1984), obwohl sie lösliches Antigen aufnehmen, prozessieren und in kostimulatorischem Kontext präsentieren können. Eine *In-Vivo*-Untersuchung von Lymphknoten mittels 2-Photonen Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass Dendritische Zellen an der Grenze der T- und B-Zellzone dicht gepackt sind und in engem Kontakt mit T- und B-Lymphozyten vorliegen (Lindquist et al. 2004). Aufgrund der kontroversen Datenlage lassen sich B-Zellen funktionell weder ausschließlich der Aktivierung noch der Tolerisierung zuordnen. Sie sind an der Modulation von T-Zellantworten bei unterschiedlichen Infektionen beteiligt, wobei sich die Ergebnisse in Abhängigkeit der Antigenstimulation und des infektiösen Agens unterscheiden: B-Zellen sind für die Induktion einer CD4-T-Zellantwort gegen manche nicht replizierende Antigene nötig (Chowdhury et al. 1996; Constant 1999; Epstein et al. 1995; Linton et al. 2000; Liu et al. 1995; Ronchese and Hausmann 1993; Topham et al. 1996; van Essen et al. 2000). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CD4-T-Zellen, sowie der Generierung einer humoralen Immunantwort. Während zahlreiche *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Daten darauf hinweisen, dass B-Zellen eine antigenspezifische Toleranz in CD4-T-Zellen induzieren können (Chen et al. 2001; Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995; Xu and Scott 2004), ist ihr Einfluss auf die CD8-T-Zellpopulation nicht abschließend geklärt. Der genaue Mechanismus, wie sie CD8-T-Zellantworten beeinflussen und regulieren können, ist bis heute unklar. Sie können z.B. die Induktion einer T-zellabhängigen Tumormunität verhindern (Qin et al. 1998). Obwohl B-Zellen kostimulatorische Moleküle exprimieren, konnte gezeigt werden, dass eine Antigen-Erkennung auf B-Zellen durch CD8-T-Zellen diese unabhängig von einer CD4-T-Zellhilfe tolerisieren kann (Bennett et al. 1998; Hollsberg et al. 1996). Nicht nur naive CD8-T-Zellen (De Bruijn et al. 1992) sondern auch CD8-T-Zellklone in sekundären *In-Vitro*-Kulturen konnten tolerisiert werden (Hollsberg et al. 1996). Studien in B-zelldefizienten Mäusen zeigten, dass B-Zellen für die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort nicht benötigt werden, da eine Aktivierung naiver CD8-T-Zellen auch in deren Abwesenheit erfolgt (Fuchs and Matzinger 1992). Andererseits können B-Zellen CD8-T-Zellantworten auch verbessern (Matsuzaki et al. 1999). Ferner scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Induktion und Erhaltung einer CD8-T-Zellgedächtnisantwort zu spielen (Fuchs and Matzinger 1992; Shen et al. 2003; Thomsen et al. 1996). Inwiefern B-Zellen für eine

antigenspezifische und lebenslange Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen durch z.B. einen gentherapeutischen Ansatz genützt werden können, bleibt zu bestimmen.

### **3.5 Gentransfer durch retrovirale Vektoren**

Retrovirale Vektoren können in verschiedenen therapeutischen und experimentellen Ansätzen einen effizienten Gentransfer vermitteln. Sie sind bis heute die beste Möglichkeit, um eine effiziente stabile Integration eines Transgens in das Genom mit einer zugleich abschätzbaren Kopienzahl zu erreichen (Crystal 1995; Kay et al. 2001; Mulligan 1993; Somia and Verma 2000). Die Vektoren basieren auf Retroviren, welche einzelsträngige RNA-Viren sind und in sieben Genera unterteilt werden: Deltaretroviren, Lentiviren, Retroviren vom Typ B, Alpharetroviren, Gammaretroviren, Retroviren vom Typ D und Spumaviren. Die in dieser Studie verwendeten retroviralen Vektoren basieren auf dem Maus-Leukämie-Virus (MLV) und gehören zum Genus der Gammaretroviren.

#### **3.5.1 Der retrovirale Lebenszyklus**

Der retrovirale Lebenszyklus kann in zwei Phasen unterteilt werden; die erste hängt von bereits existierenden viralen Proteinen und die zweite von der zellulären Transkriptions- und Translationsmaschinerie der Wirtszelle ab (Coffin JM 1997). Der Rezeptor für ecotrophe MLV, d.h. für Viren, die nur Maus-Zellen infizieren, ist ein basischer Aminosäuretransporter (Wang et al. 1991; Weiss and Tailor 1995). Nach Binden des Virus an den Rezeptor, fusioniert die virale Hülle mit der Zellmembran und das Nukleokapsid penetriert die Zelle. Im Zytoplasma wird das virale RNA-Genom im Nukleokapsid in doppelsträngige DNA revers-transkribiert und transloziert anschließend mit den bereits existierenden viralen Proteinen in den Nukleus der Wirtszelle. Im Nukleus wird die virale DNA in die zelluläre DNA integriert und von nun als Provirus bezeichnet. Das Provirus wird in genomische oder mRNA transkribiert. Die von der zellulären Transkriptionsmaschinerie gebildeten viralen Proteine verbleiben im Zytoplasma, wogegen das Hüllprotein zur Wirtszellmembran transportiert wird. Die infektiöse Virushülle bildet sich aus der Wirtszellmembran heraus, welche die viralen Hüllproteine trägt. Zeitgleich wird das Viruspartikel zusammengesetzt.

### 3.5.2 Struktur eines Retrovirus

Allen Retroviren ist die Struktur des Virions gemein (Coffin JM 1997). Dieses besitzt eine Hülle und eine durchschnittliche Größe von 100 nm. Die Hülle besteht aus einer Protein-Lipid-Schicht, in welcher Oberflächenmoleküle verankert sind. Das Nukleokapsid ist umgeben von Matrixproteinen und enthält das Genom: zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle von 7 bis 10 kb. Des weiteren befindet sich im Nukleokapsid die Integrase, Reverse Transkriptase und Protease. Das Genom kann in kodierende und nicht kodierende Bereiche unterteilt werden, die in der internen bzw. terminalen Region zu finden sind. Das Genom besitzt analog zur zellulären mRNA am 5' Ende eine Cap-Gruppe und am 3' Ende eine Polyadenylierungsstelle. Der kodierende Bereich wird von der Primer-Bindungsstelle (*primer binding site*, PBS), von der Poly-Purin-Sequenz (*polypurine tract*, PPT) und am 3' und 5' Ende von den langen terminal wiederholten Sequenzen (*long terminal repeat*, LTR) flankiert. Die LTR-Regionen setzen sich aus der redundanten Region R, der U5-Region am 5' Ende und der U3-Region am 3' Ende zusammen. Die U3- und U5-Regionen enthalten Sequenzen, die für die Replikation, die Integration des Virusgenoms in das Wirtszellgenom und die Transkription des Provirus wichtig sind. Die viralen Promotor- und Enhancer-Elemente befinden sich in der U3-Region und besitzen Erkennungsmotive für die zelluläre RNA-Polymerase und zellulären Transkriptionsfaktoren (Abb. 2).

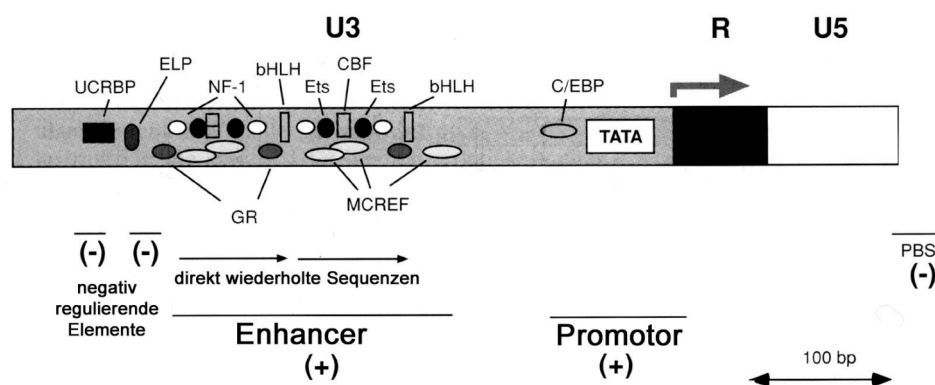


Abb. 2: Aufbau des LTRs des Maus-Leukämie-Virus (MLV, Genus der Gammaretroviren; Coffin JM 1997). Die Transkription des Virus wird durch positiv regulatorische (+) Elemente des Promotors und Enhancers reguliert. Negativ regulatorische Elemente finden sich 5' und 3' vom Promotor und Enhancer. Ferner sind bekannte Bindungsstellen von verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren eingezeichnet. Das Ende von U3 und der Beginn der Region R ist durch den Transkriptionsstartpunkt (↔) definiert.

Diese Erkennungsmotive sind den entsprechenden zellulären Gegenstücken sehr ähnlich, da die Expression des Provirus von der zellulären Transkriptionsmaschinerie abhängt. Es finden sich ferner 5' und 3' vom Promotor und Enhancer Elemente, welche die Transkription negativ regulieren. Obwohl die Größe der Region R variiert, ist sie bei jedem Retrovirus durch den Transkriptionsstartpunkt im 5'LTR und der Poly(A)-Seite im 3'LTR definiert. Obwohl der 3' und 5'LTR identisch sind, wird die Transkription vom 3'LTR supprimiert. In der Leitsequenz befindet sich das Verpackungssignal  $\Psi$ , das für die Inkorporation des retroviralen Genoms in das Viruspartikel nötig ist.

### 3.5.3 Retrovirale Vektoren

Um einerseits einen sicheren, d.h. replikationsdefizienten retroviralen Vektor zu generieren und andererseits Platz für virusfremde Gene (Transgene) zu schaffen, werden in der Regel sämtliche kodierende Bereiche aus dem viralen Genom entfernt, da diese nur in *trans* benötigt werden. Lediglich der 5'LTR und 3'LTR, sowie die Leitsequenz mit einem kurzen Abschnitt von *gag* müssen in *cis*, d.h. auf demselben Nukleinsäurestrang vorliegen. Die viralen Vektoren können sich nur in so genannten Verpackungszellen vermehren. Hierbei handelt es sich um Zellen, die stabil mit zwei Plasmiden transfiziert sind und jeweils für einen Teil der Strukturproteine kodieren (Abb. 3). Die Trennung der kodierenden Sequenzen dieser Proteine auf zwei Plasmide minimiert die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von replikationskompetenten Viren, da dazu mindestens drei simultan und unabhängig voneinander auftretende Rekombinationsereignisse stattfinden müssten (Pear et al. 1993). Es gibt eine Vielzahl von unterschiedlichen Verpackungszellen, die sich maßgeblich im Wirtstropismus des produzierten env unterscheiden. In dieser Arbeit wurden Phoenix-eco-Zellen verwendet, welche eine ecotrophe Hülle produzieren, d.h. die produzierten Viren können nur Maus-Zellen infizieren. Um einmalig infektiöse Viruspartikel zu generieren, müssen Phoenix-eco-Zellen lediglich mit dem retroviralen Vektor transfiziert werden. Diese Verpackungszelle hat sich besonders im Hinblick auf die transiente Transfektion bewährt, welche ein rasches Testen unterschiedlicher Vektoren ohne die zeitintensive Selektion einer stabilen Linie ermöglicht. Ferner kann für bestimmte retrovirale Vektoren, wie die Selbst-Inaktivierenden-Vektoren (SIN) keine stabile Linie generiert werden.



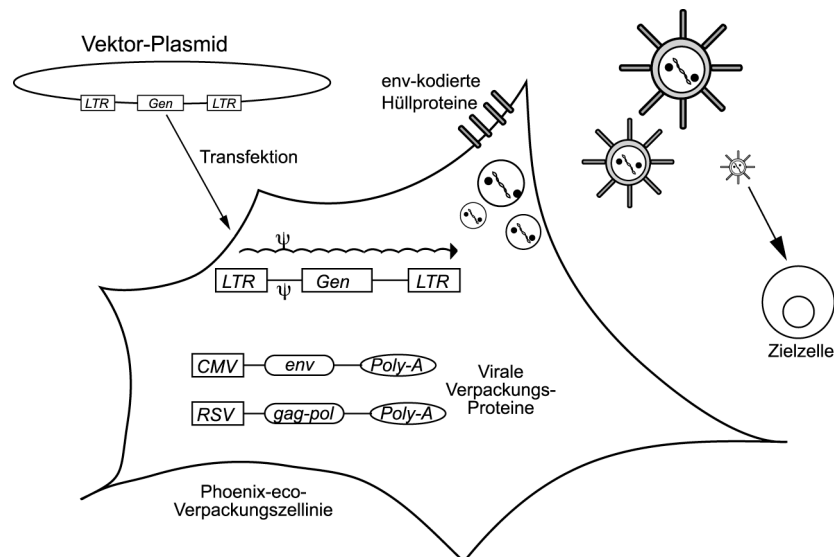


Abb. 3: Prinzip der Produktion von retroviralen Vektoren. Um retrovirale Vektorüberstände zu generieren, wird das Vektor-Plasmid in Phoenix-eco-Verpackungszellen transfiziert. Virale Partikel können sich ausschließlich in Zellen vermehren, welche die von gag, pol und env kodierten Proteine exprimieren. Phoenix-eco-Verpackungszellen sind stabil mit zwei Plasmiden transfiziert, welche für die *in trans* benötigten Proteine kodieren. CMV=Promotor des Cytomegalovirus, gag, env und pol kodieren für Virusproteine wie die Hüllproteine, Reverse Transkriptase und Integrase; LTR=lange terminal wiederholte Sequenz, RSV=Promotor des Rous-Sarcoma-Virus, Poly-A=Polyadenylierungssignal;

Es werden generell drei Arten retroviraler Vektoren unterschieden: LTR-Vektoren, SIN-Vektoren und die kürzlich entwickelten Hybrid-LTR-Vektoren (Abb. 4). In LTR-Vektoren hängt die Transkription des Transgens vom viralen Promotor/Enhancer im 5'LTR ab. Dies bedeutet, dass die Transgenexpression ubiquitär und meist stark ist. Eine räumliche, zeitliche oder quantitativ unangemessene Expression eines Transgens trägt jedoch das Risiko unvorhersehbarer und möglicherweise schädlicher Effekte, welche durch die Verwendung von gewebs- oder zellspezifischen regulatorischen Elementen in Kombination mit SIN-Vektoren vermeidbar sind. Des weiteren gibt es Hinweise, dass ein Promotor viralen Ursprungs eine höhere Wahrscheinlichkeit hat, inaktiviert (*silencing*) zu werden. In SIN-Vektoren sind im 3'LTR die in der U3-Region lokalisierten viralen Promotor- und Enhancer-Elemente deletiert (Abb. 4 und Abb. 2). Dies bedeutet, dass virale Partikel in einer transient transformierten Verpackungszelle hergestellt werden können, da der 5'LTR noch intakt und funktionell ist. Nach Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle befindet sich aufgrund des Replikationszyklus von Retroviren die Promotor/Enhancer-deletierte U3-Region des 3'LTRs auch im 5'LTR (Abb. 5). Damit hängt die Transkription des Transgens

ausschließlich von einem internen Promotor ab, der viralen als auch zellulären Ursprungs sein kann.

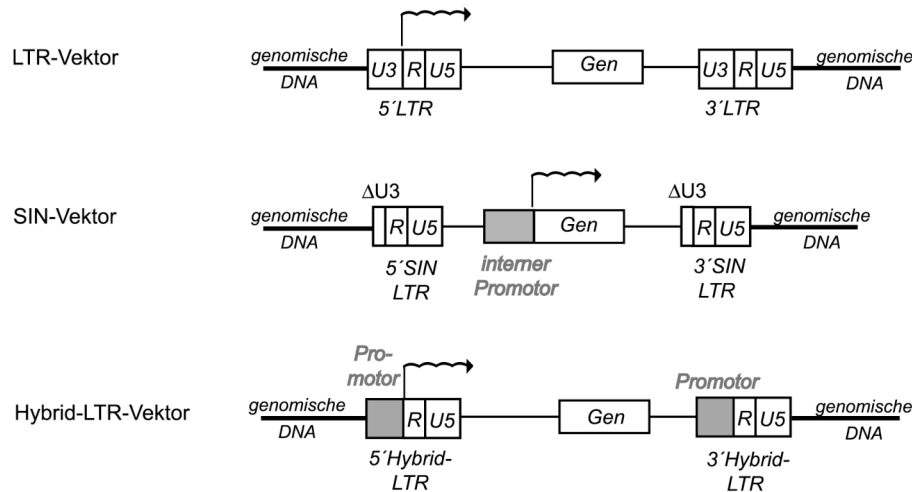


Abb. 4: Retrovirale Vektoren. Dargestellt ist ein LTR-Vektor, Selbst-Inaktivierender-Vektor (SIN) und Hybrid-LTR-Vektor. Im LTR-Vektor wird die Transgenexpression vom viralen Promotor/Enhancer im 5'LTR reguliert. Im SIN-Vektor ist der virale Promotor/Enhancer entfernt und das Transgen steht unter der transkriptionellen Kontrolle eines internen Promotors. Im Hybrid-LTR-Vektor ist der virale Promotor/Enhancer durch einen heterologen, meist zell- oder gewebsspezifischen Promotor ersetzt.

Ein wichtiges Ziel der retroviralen Vektor-Entwicklung ist die gewebs- oder zellspezifische Expressionskontrolle des Transgens. Obwohl sich der virale Vektor auf genomischer Ebene in vielen unterschiedlichen Geweben oder Zellenarten befindet, kann durch eine geeignete Auswahl des Promotors die Transkription auf bestimmte Gewebe oder Zellpopulationen beschränkt werden. Ein stark limitierender Faktor der gammaretroviralen SIN-Vektoren ist (Soriano et al. 1991; Yee et al. 1987; Yu et al. 1986) der niedrige virale Titer, welcher durch die Deletionen im U3-Bereich bedingt ist. Daher haben einige Arbeitsgruppen begonnen Hybrid-LTR-Vektoren (Abb. 4) zu entwickeln, indem sie den viralen Promotor/Enhancer-Bereich im LTR mit einem heterologen zellulären Promotor oder Enhancer ersetzten und so eine zellspezifische Expression erreichten.

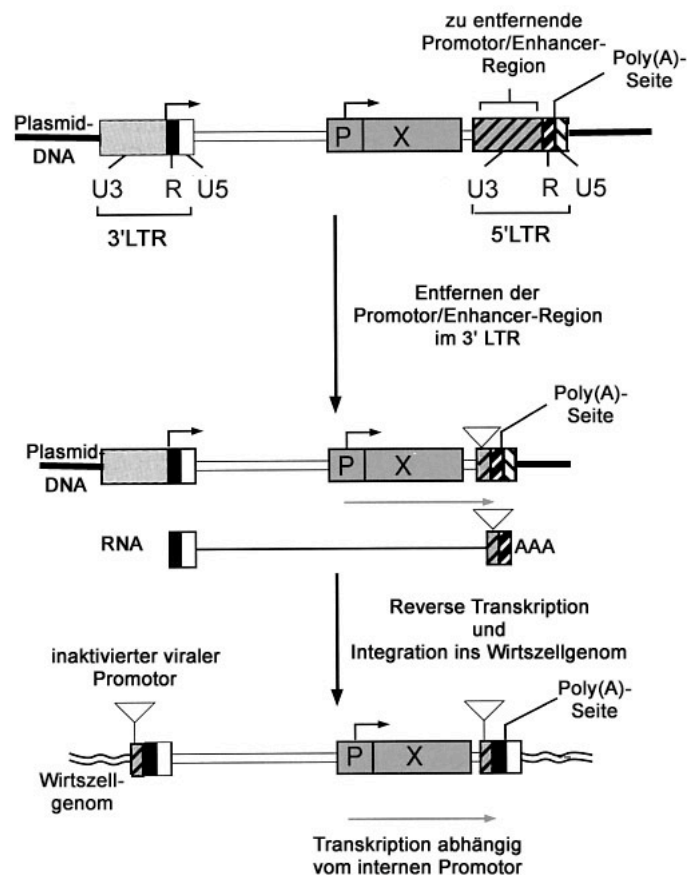


Abb. 5. Aufbau und Replikationszyklus von SIN-Vektoren (Coffin JM 1997). In einem LTR-Vektor werden die Promotor- und Enhancersequenzen in der U3-Region des 3'LTRs entfernt (oben; vgl. Abb. 2), um den Selbst-Inaktivierenden-Vektor herzustellen. Wird mit diesem Plasmid eine Verpackungszelle transfiziert, so kann noch immer virale genomische RNA hergestellt (Mitte) und in virale Partikel verpackt werden. Werden Zielzellen mit diesen viralen Partikeln transduziert, so ersetzt die U3-Region des 3'LTRs die U3-Region des 5' LTRs, aufgrund des retroviralen Replikations- und Intergrationsmechanismus (unten). So wird gewährleistet, daß in der Zielzelle die Expression des Gen X nur vom internen Promotor P abhängt.

### 3.5.4 Virale posttranskriptionell regulatorische Elemente

Der retrovirale Lebenszyklus basiert auf dem Export ungespleißter und partiell gespleißter RNA ins Zytoplasma. Der Export ungespleißter RNA aus dem Nukleus ist jedoch ineffizient. Es haben sich daher im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, welche die Notwendigkeit des Spleißens umgehen; diese sind mit *cis*-aktiven Elementen und entsprechenden viralen oder zellulären Faktoren assoziiert, welche den RNA-Transport vermitteln. Das humane Hepatitis B Virus und das Hepatitis Virus des Waldmurmeltiers (*woodchuck hepatitis virus*) benutzen posttranskriptionell regulatorische Elemente (HPRE bzw. WPRE) für den Export ihrer intronlosen RNA (Huang and Liang 1993) (Schwenter et al.

2003). Die Transgenexpression von gammaretroviralen und lentiviralen Vektoren konnte durch die Verwendung von WPRE verbessert werden, obwohl dieser Effekt stark vom verwendeten Promotor abhing (Moreau-Gaudry et al. 2001; Ramezani et al. 2000; Schambach et al. 2000; Zufferey et al. 1999) und der zugrunde liegende Mechanismus nicht vollständig verstanden ist.

### **3.6 Zielsetzung der Arbeit und Arbeitsprogramm**

Für eine zukünftige gezielte Behandlung von Autoimmunkrankheiten ist es nötig jene Zelltypen zu identifizieren, die Toleranz induzieren können und die zugrundeliegenden Mechanismen genau zu definieren. Da der Einfluss der B-Zelle auf die Funktion und insbesondere die Tolerisierung von CD8-T-Zellen nicht abschließend geklärt ist, sollte in dieser Arbeit die Rolle der B-Zelle als antigenpräsentierende Zelle bei der Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen analysiert werden. Hierfür sollte ein System zur B-zellspezifischen Transgenexpression *in vivo* etabliert werden, um eine Präsentation des Antigens im Kontext von MHC-I zu erreichen. Zahlreiche Studien belegen, dass der Erhalt der T-Zelltoleranz von der Persistenz des Antigens abhängt (Pape et al. 1998; Redmond et al. 2003; Rocha et al. 1995; Rocha and von Boehmer 1991). Daher sollte eine kontinuierliche Antigenexpression erreicht werden, indem stabil in das Genom integrierende retrovirale Vektoren zur Transduktion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSPC) verwendet werden. Eine spezifische Transgenexpression in B-Zellen sollte durch Verwendung des CD19-Promotors ermöglicht werden. Im Anschluss an die Entwicklung und detaillierte Analyse des B-zellspezifischen retroviralen Vektors, sollte dann die Auswirkung einer selektiven Antigenexpression in B-Zellen auf die Funktionalität von CD8-T-Zellen in entsprechenden Tiermodellen überprüft werden. Dabei sollte zuerst getestet werden, ob die B-zellspezifische Expression des Modellantigens zur antigenspezifischen Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires führt. Aufgrund der niedrigen Frequenz antigenspezifischer T-Zellen im polyklonalen Modell, sollte der genaue Mechanismus der Toleranzinduktion anhand von TCR-transgenen Mäusen (OT-1) untersucht werden, deren CD8-T-Zellen ein Peptid aus dem Modellantigen erkennen. Die Funktion der TCR-transgenen CD8-T-Zellen sollte ferner in einem Diabetes-Mausmodell (RIP-OVA<sup>lo</sup>) überprüft werden, welchem eine gewebsspezifische Expression des Modellantigens im Pankreas zu Grunde liegt.

Die Verwendung von transduzierten Stammzellen besitzt gegenüber den klassischen transgenen Mausstämmen zwei wesentliche Vorteile. Erstens nimmt die Transduktion von

HSPC und die anschließende Rekonstitution des hämatopoetischen Systems einer Knochenmarkschimäre nur sechs Wochen in Anspruch und umgeht somit die zeitintensive Generierung eines transgenen Mausstamms. Zweitens ist, im Gegensatz zum transgenen Modell, eine Weiterentwicklung zur gentherapeutischen Behandlung von Autoimmunkrankheiten denkbar, da der Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen bereits klinisch geprüft wird.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

Die Materialien wurden alphabetisch geordnet.

#### 4.1.1 Antikörper

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	PE	H129.9	BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)
	PerCP		
CD5	Biotin	53-7.3	BD Pharmingen
CD8	PE	53-6.7	BD Pharmingen
	PerCP		Caltag (San Francisco, CA, USA)
	APC	CT-CD8a	
CD11b	Biotin	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	APC	HL3	BD Pharmingen
CD19	PE	1D3	BD Pharmingen
	APC		
CD44	PE	IM7.8.1	Caltag
	APC	IM7	BD Pharmingen
CD45.1	Biotin	A20	BD Pharmingen
B220	FITC	RA3-6B2	BD Pharmingen
	PE		
	PerCP		
	APC		
CD62L	FITC	Mel14	BD Pharmingen
	APC		
CD69	PE	H1.2F3	BD Pharmingen
B7.2	Biotin	6L-1	BD Pharmingen
I-A <sup>b</sup>	FITC	AF6-1201	BD Pharmingen
	PE		
IgG	HRP	polyklonal	Serotec
IgG1 ( $\gamma$ 1)	HRP	polyklonal	Southern Biotech Associates, Inc., AL, USA
IgG2a ( $\gamma$ 2a)	HRP	polyklonal	
IgM	HRP	polyklonal	Serotec (Oxford, England)
IFN- $\gamma$	PE		BD Pharmingen
Ovalbumin	unmarkiert	OVA-14	Sigma
TNF- $\alpha$	PE		BD Pharmingen
V $\alpha$ 2 TCR	FITC	B20.1	BD Pharmingen
	PE		
	Biotin		
V $\beta$ 5.1/5.2 TCR	FITC	MR9-4	BD Pharmingen
	PE		
	Biotin		

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie und ELISA. Die für die jeweilige Applikation benötigte Antikörpermenge wurde für jeden Antikörper austitriert und variierte von Lieferung zu Lieferung.

APC-, PE- oder SA-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen. Das Tetramer H-2K<sup>b</sup>:OVA<sub>257-264</sub>-m $\beta$ 2m-SA-PE wurde freundlicherweise von D.H. Busch (TU München) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.2 Chemikalien

Alle Lösungen und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (St. Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

#### 4.1.3 Geräte

Brutschrank (Hera cell, von Heraeus), „ $\beta$ -Counter“ (Wallac, Perkin Elmer, Turku, Finnland), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Durchflusszytometer (FACSCalibur von Becton Dickinson), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), PCR-Maschine (Biometra), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zellerntegerät (Scatron Instruments, Oslo, Norwegen), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

#### 4.1.4 Lösungen und Medien

ACK-Puffer	8,02 g Ammoniumchlorid
	1 g Kaliumhydrogencarbonat
	37,2 mg EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat
	H <sub>2</sub> O ad 1 l
	pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch
	0,2 $\mu$ m Filter sterilfiltrieren

## Material und Methoden

---

Anästhetikum	0,25 ml 2% Rompun (BayerVital, Leverkusen) 0,5 ml 100 mg/ml Ketavet (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) PBS ad 5 ml
Auftragspuffer BSU	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H <sub>2</sub> O ad 50 ml
CFSE-Puffer	Dulbecco's PBS (Gibco) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 0,1% BSA
<u>ELISA-Puffer</u>	
10× Waschpuffer	1010 g Natriumchlorid 10 g Kaliumchlorid 10 g Kaliumdihydrogenphosphat 57,5 g Dinatriumhydrogenphosphat H <sub>2</sub> O ad 5 l
1× Waschpuffer	1 l 10×Waschpuffer 5 ml Tween 20 H <sub>2</sub> O ad 10 l
Blockierungslösung	0,05% Natriumazid (w/v) 0,5% Milchpulver (w/v, Applichem) PBS
Antikörperlösung	0,05% Tween20 (v/v) 0,5% Milchpulver (w/v)



Kaliumzitrattpuffer	<p>42 g Zitronensäure-Monohydrat</p> <p>950 ml H<sub>2</sub>O</p> <p>pH 3,95 mit KOH einstellen</p> <p>275 µl 30%-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p> <p>H<sub>2</sub>O ad 1 l</p> <p>bei 4°C im Dunkeln lagern</p>
FACS-Puffer	<p>0,01% Natriumazid (v/v)</p> <p>2% FBS (v/v)</p> <p>PBS</p>
5-Flouoro-Uracil	<p>20 mg/ml in Dulbecco's PBS (Gibco)</p> <p>pH mit NaOH auf 10-11 einstellen</p> <p>vortexen bis vollständig gelöst</p> <p>pH mit HCl auf 7,5 einstellen</p> <p>sterilfiltrieren, bei -20°C lagern</p>
MACS-Puffer	<p>Dulbecco's PBS (Gibco) ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup></p> <p>0,5% BSA</p>
PBS	<p>150 mM Natriumchlorid</p> <p>10 mM Dinatriumhydrogenphosphat</p> <p>2 mM Kaliumdihydrogenphosphat</p> <p>pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen</p>
PBSN	<p>0,05% Natriumazid (w/v)</p> <p>PBS</p>

RFI	15% Glycerin (v/v) 100 mM Kaliumchlorid 50 mM Mangan-Chlorid-Tetrahydrat 30 mM Kaliumacetat 10 mM Calciumchlorid pH 5,8 mit 0,2 mM Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
RFII	15% Glycerin 10 mM MOPS 10 mM Kaliumchlorid 75 mM Calciumchlorid pH 6,8 mit 1 N NaOH einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
<u>SDS-PAGE und Western Blot Puffer</u>	
Antikörperfärbelösung	0,05% Natriumazid (w/v) PBS
Blockierungslösung	0,05% Natriumazid(w/v) 0,5% Milchpulver (w/v, Applichem) PBS
1×Ladepuffer (Lämmli)	0,6 g TRIS 10 ml Glycerin 5 ml β-Mercaptoethanol 2 g SDS (Natriumdodecylsulfat) H <sub>2</sub> O ad 100 ml, auf pH 6,8 einstellen

---

Laufpuffer	19 g Glycerin 3 g TRIS 1 g SDS (Natriumdodecylsulfat) H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, auf pH 8,8 einstellen
Lysepuffer	8 g NaCl 6 g TRIS 0,6 g EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0,174 g PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 10 ml Igepal CA-630 H <sub>2</sub> O ad 1 l, auf pH 7,8 einstellen
Sammelgelpuffer	100 g SDS (Natriumdodecylsulfat) 121,1 g TRIS H <sub>2</sub> O ad 1 l, auf pH 8,8 einstellen
Transferpuffer	14,4 g Glycerin 3 g TRIS (pH 8,8) 200 ml Methanol H <sub>2</sub> O ad 1 l, auf pH 8,8 einstellen
Trenngelpuffer	100 g SDS (Natriumdodecylsulfat) 181,7 g TRIS H <sub>2</sub> O ad 1 l, auf pH 6,8 einstellen
<u>Transfektions-Lösungen</u>	
2xHBS	50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat mit NaOH auf pH 7,05 einstellen sterilfiltrieren und bei -20°C lagern (≤ 6 Monate)
CaCl <sub>2</sub>	2,5 M Calciumchlorid sterilfiltrieren und bei -20°C lagern

### Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien und -lösungen stammten, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma Gibco (bezogen über Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

DC-Medium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 5% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 25 ng/ml GM-CSF
HSPC-Medium	IMDM 20% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 200 U/ml hIL-6 10 ng/ml mIL-3 50 ng/ml mSCF
Phoenix-Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
Transfektionsmedium	DMEM Glutamax-I 10% FBS (inaktiviert, v/v) 100 U/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin 2,5 mM Chloroquine (Sigma)

---

T-Zellmedium	RPMI-1640
	10% FBS (inaktiviert, v/v)
	500 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	100 U/ml Penicillin
	100 $\mu$ g/ml Streptomycin

#### 4.1.5 Mausstämme

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

##### C57BL/6 und B6SJL

Der MHC-Haplotyp dieser Mausstämme ist H-2<sup>b</sup>. C57BL/6-Mäuse exprimieren das Ly5.2-Allel für CD45. Der kongene B6SJL-Mausstamm ist bis auf das Ly5.1-Allel genetisch identisch zu C57BL/6.

##### $\mu$ MT

In diesen Mäusen wurde ein Exon zerstört, das für die Transmembrandomäne des IgM-Moleküls kodiert (Kitamura et al. 1991). Die B-Zellentwicklung ist daher in diesen Mäusen auf Stufe der Prä-B-Zellen blockiert. Der Mausstamm wurde auf dem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet.

##### OT-1

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid OVA<sub>257-264</sub> im Kontext von MHC-I (H-2K<sup>b</sup>) erkennt (Hogquist et al. 1994). Der TCR kann spezifisch mit monoklonalen Antikörpern gegen V $\alpha$ 2 und V $\beta$  5.1/ 5.2 nachgewiesen werden. Dieser Mausstamm wurde sowohl auf dem C57BL/6- bzw. B6SJL-Hintergrund gezüchtet, d.h. die OT-1-T-Zellen exprimieren das Ly5.2- bzw. das Ly5.1-Allel.

##### RIP-OVA<sup>lo</sup>

Unter Kontrolle des Ratten-Insulinpromotors (*rat insulin promoter*, RIP; Blanas and Heath 1999) exprimieren RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse Ovalbumin als Autoantigen im Pankreas, in den Nieren und im Testis. Eine Immunisierung mit OVA<sub>257-264</sub> führt in Tieren, in die zuvor OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert worden waren, zur Zerstörung der  $\beta$ -Inselzellen des Pankreas und damit zu Diabetes. Die durch eine Diabetes-Erkrankung bedingte Erhöhung der Glukose-

konzentration im Urin kann mit Glukose-Teststreifen (Diabur 5000, Roche Diagnostic, Rotkreuz, Schweiz) gemessen werden.

### **4.1.6 Peptide, Proteine und Oligonukleotide**

Hühner-Ovalbumin (*albumin, chicken egg, Grade V*) und Hämocyandin (*keyhole-limpet hemocyanin*) wurden von der Firma Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Das Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) wurde von der Firma Neosystems (Straßburg, Frankreich) synthetisiert.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) hergestellt.

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

### **4.1.7 Vektoren**

#### **4.1.7.1 DNA-Immunisierungs-Vektoren**

Der für die DNA-Immunisierung verwendete Vektor CMV- $\beta$ g-OVA wurde von Henning Lauterbach (München) hergestellt (Lauterbach et al. 2004). Es handelt sich dabei um einen auf pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Die Niederlande) basierenden Vektor mit dem *immediate/early* Promotor und Enhancer des humanen Zytomegalovirus (*human cytomegalovirus*, CMV). In diesen Vektor wurde ein Fragment des Hasen- $\beta$ -Globingens eingeführt, welches ein Intron und eine Polyadenylierungsstelle enthält, um die posttranskriptionelle Modifikation des Transgens und damit seine Expression zu verbessern (Kouskoff et al. 1993).

#### **4.1.7.2 Herpes Simplex Vektoren**

Die replikationsdefizienten, rekombinanten HSV-1-Vektoren HSV-OVA und HSV-GFP wurden im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) konstruiert und hergestellt (Lauterbach et al. 2004). Beide Konstrukte basieren auf dem Vektor T0ZGFP (Krisky et al. 1997). In diesem Vektor wurden die essentiellen *immediate early*-Gene ICP4, ICP27 und das Gen ICP22 deletiert. Die Expressionskassette hCMV- $\beta$ -Globin-OVA wurde in den UL41-Lokus inseriert.

### 4.1.7.3 Klonierungsvektor

Zur Subklonierung von Restriktionsfragmenten wurde das Plasmid pBluescript-II-KS<sup>+</sup> (Stratagene, Amsterdam, Die Niederlande) verwendet.

### 4.1.7.4 Retrovirale Vektoren

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren sind in Form von Plasmidkarten im Anhang zu finden.

Die hier verwendeten SIN-Vektoren basieren auf SIN-SF (Kraunus et al. 2004). In diesem Vektor ist die Promotor/Enhancer-Region im 3'LTR deletiert, so dass nur die ersten 22 bp und die letzten 14 bp der U3-Region vorhanden sind. Der 5'LTR von SIN-SF stammt von Maus-Embryonalen-Stamm-Zell-Virus MESV (*murine embryonic stem cell virus*) ab, der sich vom Moloney-Maus-Leukämie-Virus durch sieben Punktmutationen in der Enhancer-Region unterscheidet (Grez et al. 1991). Der interne SFFV-Promotor (SFFV, *Spleen Focus-Forming Virus*, zu MLV gehörend) von SIN-SF stammt aus pSF110 (Schambach et al. 2000) und sitzt 3' nach dem Verpackungssignal bzw. 5' vor dem Reportergen eGFP.

Um den Vektor SIN-SF-W zu generieren, wurde die WPRE-Sequenz aus pSFβ91 (Schambach et al. 2000) als *Eco* RI-Fragment isoliert und in pSIN-SF kloniert. SIN-CD19-W, der den humanen CD19-Promotor in Kombination mit WPRE enthält, basiert auf SIN-SF-W. Dazu wurde ein 999-bp-Fragment (-1018 bp bis -19 bp, Abb. 6) des humanen CD19-Promotors mittels PCR von einem Plasmid amplifiziert, das 4,2 kb der 5' untranslatierten Region des humanen CD19-Gens trägt (Kleindienst et al. 2000). Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet: CD19-vorwärts 5'-ATCTATAGCGGCCGCTTTTCTGAGTCCCTGCAGCAGTG-3' (enthält eine *Not* I-Restriktionsschnittstelle) und CD19-revers 5'-ATAACCGGTCGCGAGCACCCAGCTTCGCGCA-3' (enthält eine *Nru* I- und eine *Age* I-Restriktionsschnittstelle). Die amplifizierte Sequenz wurde als *Not* I/*Age* I-Fragment in pSIN-SF-W kloniert und ersetzt das SFFV-Promotor/Enhancer-Element. Um SIN-CD19 zu konstruieren, wurde der CD19-Promotor in Kombination mit eGFP als *Not* I/*Eco* RI-Fragment aus SIN-CD19-W in pBS-II-KS<sup>+</sup> subkloniert und als *Not* I/*Hind* III-Fragment in SIN-SF kloniert.

Um Vektoren mit einer B-zellspezifischen Expression von sezerniertem (SIN-CD19-sOVA-W) bzw. membranständigen (SIN-CD19-TfrOVA-W) Hühnerei-Albumin (OVA) zu generieren, wurde sOVA bzw. TfrOVA aus vorhandenen Vektoren (CMV-βg-OVA bzw. CMV-βg-TfrOVA, von Henning Lauterbach hergestellt) als *Eco* RI/*Xba* I-Fragment isoliert, subkloniert und über die Restriktionsschnittstellen *Not*I/*Hind*III in SIN-CD19-W eingeführt.

Um Hybrid-LTR-Vektoren zu generieren, in welchen der virale Promotor/Enhancer-Bereich im 3'LTR durch eine kurze (SF-CD19s-W) bzw. eine lange (SF-CD19l-W) Version des humanen CD19-Promotors ersetzt ist, wurde ein 347-bp- bzw. das schon zuvor benutzte 999-bp-Fragment des Promotors mittels PCR amplifiziert. Für das kurze bzw. lange Fragment wurden die Oligonukleotide CD19s-vorwärts 5'- ATCTATGCTAGCTGAGAAGGAGTC-TATGTGCCAGCATTG-3' bzw. CD19l-vorwärts 5'- ATCTATGCTAGCTGGCCGCTTT-TCTGAGTCCCTGCAGCAGTG-3' (beide Oligonukleotide enthalten eine *NheI* Restriktionsschnittstelle) und CD19-revers 5'-GTTGTGAGCTCTTTTATAGAGCACGGTC-GCGAGCACCCAGCTTCGCGCAG-3' (enthält eine *Sac I*-Restriktionsschnittstelle) verwendet. Die entsprechenden Fragmente wurden über *Nhe I*- und *Sac I*-Restriktionsschnittstellen in den 3'LTR von pSFβ91 eingeführt.

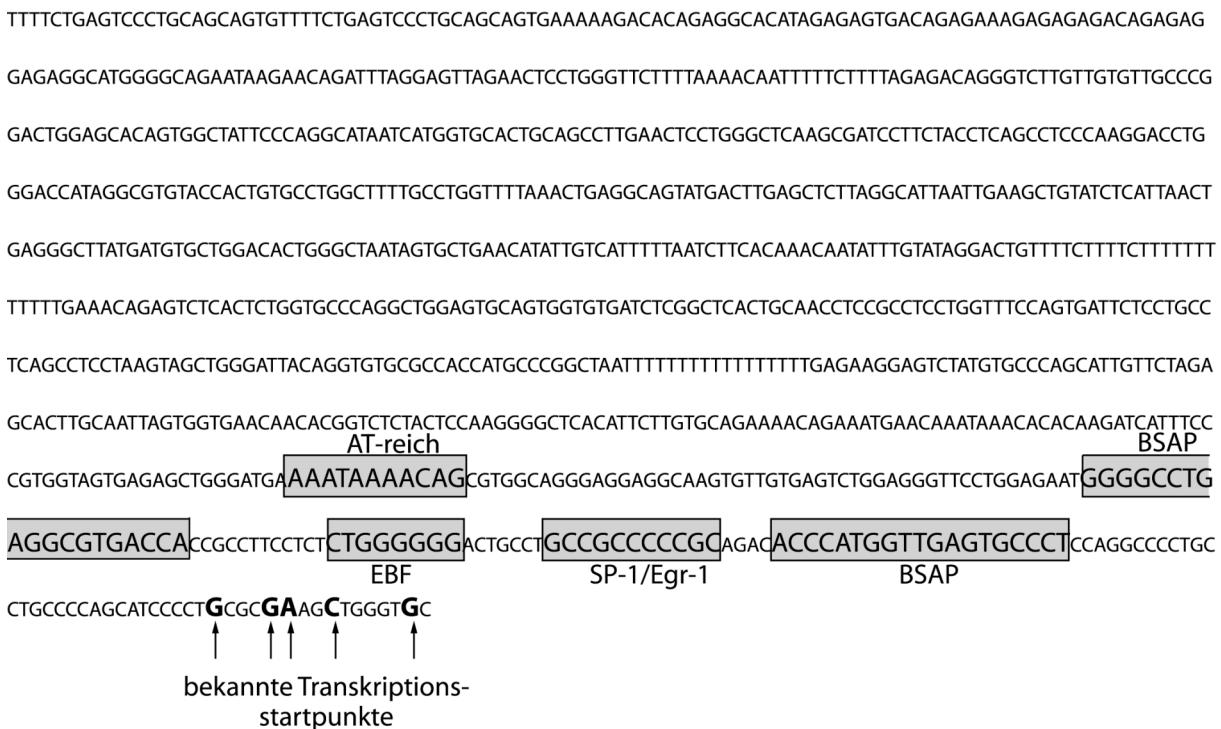


Abb. 6: Sequenz des 999-bp-Fragments des humanen CD19-Promotors. Die Sequenz entspricht dem Bereich von -1018 bis -19, gerechnet vom Translationsstartcodon des CD19-Gens. Die grau unterlegten Boxen zeigen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die Pfeile geben die bekannten Transkriptionsstartpunkte des CD19-Gens an. EBF=früher B-Zellfaktor (*early B-cell factor*), BSAP=B-zellspezifisches Aktivator Protein (*B cell-specific activator protein*);



### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmal-Spritzenfilter (0,2 + 0,45 $\mu\text{m}$ )	Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA
Flaschenfilter	Nalgene Nunc Int., Rochester, NJ, USA
Einmal-Injektionskanülen 26 G x 1/2“	Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen 5 ml	Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

Sonstige Zellkulturmaterialien und -plastikwaren wurden von den Firmen Falcon, Becton Dickinson (Franklin Labs. NJ, USA), Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen) erworben.

## 4.2 Methoden

Die Methoden wurden alphabetisch geordnet.

### 4.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung, Isolierung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. In Abhängigkeit der erwarteten Größe der Fragmente wurden Horizontal-Gele verwendet, die 0,7% bis 2% [w/v] Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurden zur späteren optischen Analyse der DNA-Banden im UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen) 4  $\mu\text{l}$  pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1%-igen [w/v] Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben zu 1/5 ihres Volumens mit Auftragspuffer vermischt. Als Längenstandard wurde eine 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München) mit 1 $\times$ TAE als Laufpuffer. Nach der

Elektrophorese wurden die Gele mit einem Gel-Dokumentationssystem (Intas, Göttingen) fotografiert.

### **4.2.1.2 Bakterienkultur**

Transformierte Bakterien wurden in LB-Medium (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) kultiviert. Zur Selektion wurden 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zugesetzt, da alle hier verwendeten Plasmide und Vektoren das Ampicillin-Resistenzgen enthielten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Bakterienschüttler (Infors, Bottmingen, Schweiz). Zur Kultur auf festem Medium wurden LB-Agarplatten (7.5g Agar/500 ml LB-Medium) mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin verwendet und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer Über-Nacht-kultur mit 1 ml Glycerin sorgfältig vermischt und bei -80°C gelagert.

### **4.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch (UV-Spektrophotometer Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H<sub>2</sub>O bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD<sub>260</sub>-Einheit 50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger DNA pro ml. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. DNA-Lösungen mit einem geringen Proteinanteil haben einen Quotienten von 1,8-2,0.

### **4.2.1.4 Herstellung chemokompetenter Bakterien**

Eine Über-Nacht-Kultur einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde 1/100 in 100 ml LB-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> verdünnt, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde bei 3000 g und 4°C für 25 min zentrifugiert, in 40 ml eisgekühltem RFI-Medium resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml RFII-Medium resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots zu 100  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Die Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

Es wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Genotyp supE44,  $\Delta\text{lacU169}$  ( $\Phi\text{80d lacZ}\Delta\text{M15}$ ), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1; Hanahan 1983)) verwendet.

#### 4.2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden zunächst unter UV-Licht ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung des gewünschten Fragments aus dem Agarosestück wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde mit 30-50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA (bis 20  $\mu\text{g}$ ) aus Bakterien wurden QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden) Plasmid Maxi Kits gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

In der Regel wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente enzymatisch so gespalten, dass sie überhängende oder stumpfe, zueinander komplementäre Enden besaßen. Die Reaktion wurde in Ligasepuffer mit 400 U T4-Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 100 ng gespaltenem Vektor und der zwei- bis dreifachen Menge des zu inserierenden DNA-Fragments in einem Endvolumen von 15  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur oder bei  $4^\circ\text{C}$  und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz zur Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien verwendet.

#### 4.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### a) PCR für Klonierungsarbeiten

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis et al. 1986) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, um die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen einzuführen. Es wurde die hitzstabile *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet, die im Vergleich zu anderen thermostabilen Polymerasen (wie *Taq*) eine sehr kleine Fehlerrate und zugleich eine hohe Korrekturlese-Funktion hat. War die Amplifizierung mit *Pfu* problematisch, so wurde die *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Sequenzierung überprüft.

### PCR-Reaktionsbedingungen

*Taq*:

5-50 ng Plasmid-DNA

1  $\mu$ M Primer 1

1  $\mu$ M Primer 2

50 mM MgCl<sub>2</sub> (50 mM)<sup>#</sup>

1xNH<sub>4</sub>-Puffer<sup>#</sup>

200  $\mu$ M dNTP-Mix (10 mM)<sup>\*</sup>

1,25 U *Taq* DNA Polymerase <sup>#</sup>

mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auf 25  $\mu$ l einstellen

*Pfu*:

5-50 ng Plasmid-DNA

0,5  $\mu$ M Primer 1

0,5  $\mu$ M Primer 2

1xPfu-Buffer<sup>##</sup>

200  $\mu$ M dNTP-Mix (10 mM)<sup>\*</sup>

2,5 U *Pfu* DNA Polymerase <sup>##</sup>

mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auf 50  $\mu$ l einstellen

<sup>#</sup>Pan Biotech GmbH, Aidenbach; <sup>##</sup> Stratagene , Amsterdam, Die Niederlande<sup>\*</sup> Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA

Die Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) und die Anlagerungstemperatur (T<sub>A</sub>) wurden mittels folgender Formel berechnet: T<sub>M</sub> = [(G+C) x 4°C] + [(A+T) x 2°C]

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

Zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) wurden in der Regel folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

28-31  
Zyklen

5 min 95°C  
30 sec 95°C  
30 sec T<sub>A</sub> (Primer-abhängig)  
1-4 min 72°C: 2 min/kb *Pfu*, 1 min/kb *Taq*  
10 min 72°C

### ***b) quantitative PCR zur Bestimmung des Titers der retroviralen Vektoren***

Genomische DNA wurde mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert und in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert. Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler System (Roche Diagnostics, Penzberg) durchgeführt. Dazu wurde ein 162-bp-Fragment der eGFP-cDNA mit den Oligonukleotiden gfp-vorwärts 5'-TATATCATGGCCGACAAGCA-3' und gfp-revers 5'-ACTGGGTGCTCAGGTAGTG-3' vervielfältigt. Zur internen Standardisierung wurde ein Fragment des *brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)* Gens in einem separaten Reaktionsansatz amplifiziert. *Bdnf* liegt

als Einzelkopie-Gen vor (Hofer et al. 1990), so dass über das Verhältnis der Kopienanzahl von eGFP zu *Bdnf* normalisiert werden kann. Mit den Oligonukleotiden *bdnf*-vorwärts 5'-ACGACATCACTGGCTGACAC-3' und *bdnf*-revers 5'-CATAGACATGTTTGCGGCATC-3' wurde ein 206-bp-Fragment von *Bdnf* amplifiziert. Jeweils 1  $\mu$ l DNA wurde in Gegenwart von 8  $\mu$ M Oligonukleotid-Paar (für eGFP oder *Bdnf*), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1xLC-FastStart DNA Master SYBR Green I gemessen. Jede Probe wurde in Duplikaten angesetzt, sowie in drei unabhängigen Reaktionen getestet. Die PCR-Konditionen waren wie folgt: ein anfänglicher Denaturierungsschritt von 95°C für 10 Minuten, dann für die nächsten 40 Zyklen bei 95°C für 10 Sekunden. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 60°C für 5 Sekunden und die Verlängerungsreaktion bei 72°C für 10 Sekunden.

Für jede der beiden Reaktionen (eGFP oder *Bdnf*) wurde der PCR-Zyklus, der das erste Signal oberhalb eines bestimmten Signalschwellenwertes generierte, als der Kreuzpunkt (*crossing point*, CP) bestimmt. Der Prozentsatz vektortragender Zellen wurde auf Basis der Differenz zwischen dem CP (Delta CP) der eGFP-PCR und der *Bdnf*-PCR mit Hilfe einer Standardkurve berechnet. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde genomische DNA einer Maus-B-Zelllinie mit nur einer eGFP-Kopie verwendet (mb-1 MCM:mEGFP, freundlicherweise von Elias Hobeika, Freiburg, zur Verfügung gestellt). Von dieser DNA wurden 10-fach Verdünnungen angefertigt und für die quantitative PCR eingesetzt.

#### **4.2.1.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Charakterisierung und Identifizierung von DNA-Proben anhand von Restriktionsfragmenten oder deren Vorbereitung für Klonierungen wurde die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entsprechend den Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente durch Agarosegelelektrophorese analysiert, separiert oder mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt.

#### **4.2.1.10 Transformation chemokompetenter Bakterien**

Für jede Transformation wurde ein Aliquot (100  $\mu$ l) chemokompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes bzw. 0,5-1  $\mu$ g Plasmid-DNA und kurzem Vermischen, wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend für 90 sec in einem Wasserbad einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und dann wieder für 2 min auf Eis gestellt. Um die Expression des Resistenzgens zu erlauben wurde 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach

der Inkubation wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

## 4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

### 4.2.2.1 Adoptiver Zelltransfer

Diese Methode ermöglicht das Verhalten antigenspezifischer T-Zellen *in vivo* zu verfolgen. Eine Population von T-Zellen, die ein spezifisches Antigen erkennt, ist in der Regel zu klein (< eine pro 100.000 Zellen), um in einem nicht immunisierten Tier gemessen zu werden. Auch in immunisierten Tieren sind die Frequenzen zu gering (ca. eine pro 10.000 Zellen; Tse et al. 1980), um die Zellen mit Antikörpern zu messen. Alternativ können diese Zellen mit MHC:Peptid-Tetrameren analysiert werden. TCR-transgene Tiere können nicht direkt immunisiert werden, da sich viele T-Zellen mit der gleichen Spezifität gegenseitig blockieren (Kearney et al. 1994). Durch einen Transfer von T-Zellen in normale syngene Empfängertiere kann dieses Problem umgangen werden. So entsteht im Rezipienten eine Peptid:MHC-spezifische T-Zell-Population, welche groß genug ist, um durch Antikörper gemessen zu werden, die gegen den TCR gerichtet sind. Andererseits ist die Population auch klein genug, um eine Antigenantwort im Rahmen einer Immunisierung zu ermöglichen (Pape et al. 1997). Für den adoptiven T-Zelltransfer wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten aus OT-1-TCR-transgenen Mäusen hergestellt. Die Erythrozyten in der Milzzellsuspension wurden lysiert. Um den prozentualen Anteil der transgenen T-Zellen zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Um Zellaggregate zu entfernen, wurde vor der Injektion die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße 51  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Die Zellen wurden nur in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse transferiert.

### 4.2.2.2 Bestimmung des viralen Titers

$4 \times 10^4$  NIH3T3-Zellen/Loch einer 24-Lochplatte wurden am Vorabend in Phoenix-Medium ausplattiert. Vier zusätzliche Proben wurden zur Bestimmung der Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion angesetzt. Am nächsten Tag wurde eine serielle Verdünnungsreihe (1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 und 1/1000) aus Vektorüberständen in Phoenix-Medium hergestellt. Die Transfektionslösungen wurden mit 8  $\mu\text{g/ml}$  Polybrene (Hexadimethrine-Bromid, Sigma) versetzt. Die NIH3T3-Zellen wurden mit je 1 ml der Verdünnungsreihe durch Spin-Infektion transduziert. Dazu wurden die 24-Lochplatten mit Parafilm umwickelt und für zwei Stunden

bei 32°C mit 300 g zentrifugiert. Nach weiteren vier Stunden Inkubation bei 32°C im Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>), wurde das Transduktionsmedium durch Phoenix-Medium ersetzt. Zwei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, abzentrifugiert (300 g, 4°C, 5 min) und in 200 µl PBS aufgenommen. Der Anteil eGFP-positiver Zellen wurde entweder mittels Durchflusszytometrie oder quantitativer PCR (siehe 4.2.1.8) bestimmt. Der virale Titer wurde auf Basis der Frequenz transgenpositiver Zellen, der Verdünnung und der Zellzahl als transduzierende Einheit/ml (*transducing unit* TU/ml) berechnet. Zur Ermittlung des Titers wurden nur die Daten der Verdünnungen verwendet, die eine Frequenz von 10-50% eGFP-positiver Zellen aufwiesen:

$$\text{TU/ml} = \% \text{ eGFP}^+ \text{ Zellen} \times \text{Verdünnung} \times \text{Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion}$$

#### 4.2.2.3 CFSE-Färbung

Eine Zellproliferation kann z.B. über die Verdünnung von CFSE oder CFDA-SE (*carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester*) durchflusszytometrisch gemessen werden. CFSE bindet irreversibel an intra- und extrazelluläre Proteine, indem es mit deren Lysin-Seitenketten und anderen Amingruppen reagiert. Teilt sich die CFSE-markierte Zelle, besitzen beide Tochterzellen nur noch die Hälfte der CFSE-Färbung und damit der Fluoreszenzintensität. Daher kann jede nachfolgende Generation einer Population proliferierender Zellen anhand der halbierten Fluoreszenzintensität identifiziert werden.

Die zu färbenden Zellen wurden mit 12 µM CFSE in CFSE-Puffer (PBS mit 0,1% BSA) für 10 min bei 37°C im Wasserbad gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen T-Zellmedium gestoppt. Das im CFSE-Puffer enthaltene BSA gewährleistet, dass die Färbung nicht zu intensiv ist und dadurch nicht mit anderen Fluorochromen in der FACS-Analyse interferiert.

#### 4.2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die relative Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim Passieren einer einzelnen Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen sind granulärer als Lymphozyten, dabei aber deutlich kleiner als Granulozyten. Die an

der Zelloberfläche gebundenen und fluorochrommarkierten Antikörper absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch sogenannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen können bestimmte Zellpopulationen durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm (*Dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur<sup>TM</sup>-Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm). Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) und die Datenanalyse mit CellQuest- oder FlowJo -Software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

### ***a) Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern***

Zu 50-100  $\mu$ l Zellsuspension in einem 5 ml Reaktionsröhrchen wurde das gleiche Volumen an doppelt konzentrierter, in kaltem FACS-Puffer angesetzten Antikörperlösung gegeben, gemischt und für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die unterschiedlichen Antikörper waren zuvor titriert worden und wurden in einer entsprechenden Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. War der primäre Antikörper biotinyliert, so wurde noch mit Fluorochrom konjugiertem Streptavidin gefärbt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 100-200  $\mu$ l in dem Reaktionsgefäß. Wurde eine Antikörperfärbung in 96-Lochplatten durchgeführt, so wurde dreimal in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Die Platten wurden für 3 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgekippt. In der Regel wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Analyse gelagert.

### ***b) Intrazelluläre Zytokinfärbung ex vivo***

Um die Zytokinproduktion von aktivierten T-Zellen nachzuweisen, müssen diese nach Isolierung und Herstellung einer Einzelzellsuspension noch einmal für fünf Stunden *in vitro* mit Peptid restimuliert werden. Innerhalb dieser kurzen Stimulationszeit werden keine naiven T-Zellen, sondern nur bereits voraktivierte Zellen zur Zytokinproduktion angeregt.



10-20x10<sup>6</sup> Milzzellen wurden in 2 ml T-Zellmedium mit 10<sup>-6</sup> M Peptid in Gegenwart von 1 µl Golgi-Stop/ml für 5 Std bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer 24-Lochplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmarker mit Fluorochrom konjugierten Antikörpern in 5 ml Reaktionsröhrchen gefärbt. Die Zellen wurden dann mit 250 µl Cytoperm Lösung/Röhrchen (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) für 20 min bei 4 °C fixiert. Um die Zellmembran für den intrazellulären Antikörper permeabel zu machen, wurden die Zellen einmal mit 1 ml Perm/Wash Puffer (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit den Fluorochrom konjugierten intrazellulären Antikörpern für 30 min bei 4°C im Dunkeln in 96-Lochplatten gefärbt. Die intrazellulären Antikörper wurden in Perm/Wash Puffer vorverdünnt, um die Permeabilität der Zellmembran aufrecht zu halten. Die Zellen wurden nach der Färbung 3 mal in 250 µl Perm/Wash Puffer gewaschen (3 min, 300 g, 4°C), mit 2% PFA fixiert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### ***c) Tetramerfärbung***

T-Zellpopulationen, welche während einer Immunisierung aktiviert werden und expandieren, besitzen ein diverses TCR Repertoire. Die wenigen epitop- bzw. peptidspezifischen T-Zellen können mit ihrem natürlichen Liganden, dem MHC-I:Peptid Komplex gemessen werden. Um die Avidität dieser Interaktion zu erhöhen, verwendet man MHC:Peptid-Komplexe, welche zu Tetrameren multimerisiert sind. MHC-I-Tetramere, die mit einem Fluorochrom konjugiert sind können in der Durchflusszytometrie verwendet werden und ermöglichen so die hoch sensitive Detektion und Isolation von epitopspezifischen T-Zellpopulationen *ex vivo*.

Pro Probe wurde 1 µl des H-2K<sup>b</sup>:OVA<sub>257-264</sub>-mß2m-SA-PE Tetramers (Busch et al. 1998) (freundlicherweise von D.H. Busch, TU München, zur Verfügung gestellt) zur Färbung in 25 µl FACS-Puffer für 30 min bei 4°C und im Dunkeln eingesetzt. Anschließend wurde mit einer doppelt konzentrierten Antikörperlösung von anti-CD8-APC (Klon CT-CD8α) für weitere 20 min bei 4°C und im Dunkeln gefärbt. Es darf auf keinen Fall ein anti-CD8-Antikörper verwendet werden, der auf dem Klon 53-6.7 (BD Pharmingen) basiert, da dieser an die α3-Domäne des H-2K<sup>b</sup> Moleküls des Tetramers bindet. Die spezifische Interaktion zwischen diesem MHC-I-Molekül und CD8 wird durch den anti-CD8-Antikörper CT-CD8α blockiert. Nach einem einmaligen Waschschrift mit FACS-Puffer, wurden die Zellen mit 2% PFA fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C aufbewahrt.

#### **4.2.2.5 Entnahme von Blutproben und Organen der Maus**

##### ***a) Lymphozytenanreicherung und Serumgewinnung aus peripherem Blut***

Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 100 bis 150  $\mu$ l) Blut entnommen und sofort mit ca. 50  $\mu$ l Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer (RT) wurde 1 ml Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) (RT) unterschichtet und 30 min bei 450 g und 25°C zentrifugiert. In der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation reichern sich Lymphozyten aufgrund ihrer Dichte in der entstehenden Interphase an, während die Erythrozyten sedimentieren. Der Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues 5 ml Reaktionsgefäß mit 3 ml kaltem FACS-Puffer überführt und 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf ca. 100  $\mu$ l abgesaugt.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut nicht mit Heparin vermischt, sondern 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei 3000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

##### ***b) Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension***

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels cervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Die Lymphknoten wurden mit feinen Pinzetten entnommen und in FACS-Puffer auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Milz wurde mit einer feinen Schere herausgelöst und in FACS-Puffer auf Eis gelagert. Knochenmark wurde aus den Ober- und Unterschenkel beider Beine gewonnen. Mit einer Schere wurde an jeder Seite der Knochen geöffnet und das rote Knochenmark mit einer Spritze (20 ml, Braun) und Dulbecco's PBS in ein 50 ml Röhrchen gespült. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milz und Lymphknoten wurden die Organe in einer Petrischale ( $\varnothing$  5 cm) mit etwas FACS-Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Porengröße 100  $\mu$ m) und mit dem Stempel einer 1 ml Injektionsspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen.

**c) Erythrozytenlyse**

Um die Erythrozyten aus einer Milzzellsuspension zu entfernen wurde das Milzzell-Pellet in 4 ml ACK Puffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit 10 ml FACS Puffer verdünnt und bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

**d) Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität**

Alle primären Zellen wurden mit Hilfe des Coulter Counters Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) gezählt. Das Zählprinzip beruht auf der Detektion und Messung einer Widerstandsänderung, die eine Zelle auslöst, wenn sie in einer elektrisch-leitfähigen Flüssigkeit suspendiert ist und durch eine Kapillaröffnung tritt. Aus dem Durchtritt jeder einzelnen Zelle resultiert ein elektrischer Impuls, der für die Zählung und Größenbestimmung geeignet ist. Während die Anzahl der Impulse die Zahl der Zellen angibt, hängt die Amplitude des elektrischen Impulses von der Größe der Zelle ab. Diese Methode erlaubt über elektronische Auswahl der ausgelösten Impulse die selektive Zählung von Zellen in sehr engen Größenverteilungen. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) können auch lebende von toten Zellen und Erythrozyten unterschieden werden.

**4.2.2.6 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)**

Mit Hilfe einer enzymvermittelten Reaktion können mit einem ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) Antikörper gemessen werden, die gegen ein bestimmtes Antigen gebildet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden ein ELISA zur Detektion von Serumantikörpern gegen OVA (Hühnerei-Albumin) oder KLH (Hämzojanin) durchgeführt. Dazu wurden 96-Lochplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) mit OVA oder KLH (150 µg/ml) beschichtet. Es wurden jeweils 50 µl pro Loch der Antigen/PBSN-Lösung in die Platten pipettiert, die anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten fünfmal mit PBS gewaschen und dann mit 50 µl/Loch Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe der zu testenden Seren (50 µl/Loch), die entsprechend in Blockierungspuffer verdünnt waren. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut fünfmal gewaschen. Der primäre Antikörper, der gegen Immunglobuline der Maus gerichtet ist, wurde in Antikörperlösung verdünnt, mit 50 µl/Loch eingesetzt und für

weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten wieder fünf Waschschrte und anschließend die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Substratlösung pro Loch. Die Färbereaktion wurde je nach Geschwindigkeit des Farbumschlags nach fünf bis 10 Minuten durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Loch gestoppt. Die Färbung der einzelnen Ansätze wurde mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts (Vmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) als Funktion der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 690 nm gemessen. Die Waschschrte erfolgten mit einem automatischen Waschgerät (96 PW, SLT Labinstruments, Gröding, Österreich).

Zur Detektion von Ovalbumin in peripherem Blut, wurde ein vorgefertigter Test (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA) verwendet. Dieser Test basiert auf einer OVA-beschichteten Testplatte, zu welcher 20  $\mu\text{l}$  der Standardlösungen bzw. Seren und 80  $\mu\text{l}$  des Antikörper-HRP-Konjugats zugegeben und für 60 min bei RT inkubiert werden. Nach fünfmaligem Waschen der Platte mit je 250  $\mu\text{l}$  Waschlösung/Loch und einer Multikanalpipette, wurden 100  $\mu\text{l}$ /Loch TMB-Lösung zugegeben und für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ /Loch gestoppt. Da der Antikörper gegen OVA gerichtet ist, bindet umso weniger Antikörper-HRP-Konjugat an das OVA der Testplatte je mehr OVA in der Standardlösung bzw. dem Serum enthalten ist. Dies bedeutet, dass die gemessene OD umso geringer ausfällt je höher die OVA-Konzentration in der Standardlösung bzw. dem Serum ist.

### **4.2.2.7 Generierung von CD8-Gedächtniszellen**

CD8-T-Zellen aus OT-1-Mäusen ( $\text{Ly}5.1^+$ ) wurden *in vitro* für vier Tage auf kongenen SIINFEKL-beladenen Milzzellen ( $\text{B}6\text{SJL}$ ,  $\text{Ly}5.2^+$ ) inkubiert. Nach vier Tagen wurde der Prozentsatz  $\text{Ly}5.2$ -positiver lebender Zellen bestimmt. Da die Kultur nur noch aus  $\text{Ly}5.1$ -positiven Zellen bestand, wurde auf eine Aufreinigung dieser Zellen verzichtet und  $20 \times 10^6$  Zellen wurden in jeweils eine  $\text{C}57\text{BL}/6$ -Maus ( $\text{Ly}5.2^+$ ) transferiert. Nach drei Wochen wurden die  $\text{Ly}5.1$ -positiven Gedächtniszellen aus Milz und Lymphknoten isoliert, indem alle  $\text{Ly}5.2$ -positiven Zellen über MACS depletiert wurden. Ferner wurde ihr Phänotyp anhand der Expression von  $\text{Ly}6\text{C}$  überprüft.

### **4.2.2.8 Generierung von Knochenmarkschimären**

Zehn bis 15 Wochen alte Mäuse wurden an Tag -2 und 0 mit 550 rad einer Cäsium-137-Quelle (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Kanata ,Ontario, Kanada) bestrahlt. Vier Stunden nach der letzten Bestrahlung wurden pro Maus 1 bis  $3 \times 10^6$

transduzierte HSPC i.v. injiziert. Für eine nicht myeloablative Konditionierung wurden die Tiere mit 300 rad oder 550 rad an Tag -1 bestrahlt und an Tag 0 mit HSPC rekonstituiert. Um eine mögliche bakterielle Infektion während der ersten drei Wochen der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser Neomycin zugegeben (1,17g/l Trinkwasser).

#### 4.2.2.9 Generierung von retroviralen Vektorüberständen

Phoenix-eco Zellen wurden durch Calcium-Phosphat transfiziert. Dazu wurden  $7,5 \times 10^6$  Zellen am Vorabend auf einer 100 mm Zellkulturplatte ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 8 ml warmes (RT) Transfektionsmedium ersetzt. 60  $\mu\text{l}$  ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) Vektor-Plasmid wurden mit 615  $\mu\text{l}$  sterilem Millipore-Wasser und 75  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zuletzt wurden 750  $\mu\text{l}$  2xHBS zugegeben und sofort für 8 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die zu transfizierenden Zellen gegeben und im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen einmal mit 5 ml warmen (RT) Dulbecco's PBS (kein  $\text{Ca}^{2+}$ , kein  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und das Transfektionsmedium wurde durch 10 ml Phoenix-Medium ersetzt. 24, 36 und 48 Stunden nach der Transfektion wurde erneut das Medium durch 6 ml Phoenix-Medium ersetzt und die Zellen zur Generierung von Vektorüberständen bei  $32^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 12 bis 16 Stunden wurde der Überstand mit einer 20 ml Einmalspritze vorsichtig abgenommen und eventuell abgelöste Phoenix-eco Zellen durch Filtration mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) entfernt. Die Vektorüberstände wurden entweder sofort zur Transduktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.2.2.10 Immunisierungen

##### a) Gene-Gun-Immunisierung

Die *Gene-Gun*-Immunisierung ist eine physikalische Methode der Zelltransformation, bei der mit DNA beladene Goldpartikel direkt in die Zielzellen geschossen werden. Die Technik wurde zunächst als eine Methode des Gentransfers in Pflanzen (Boynton et al. 1987; Bruce et al. 1989) beschrieben. Später wurde auch die Anwendung in experimentellen Säugetiermodellen (Yang et al. 1990) gezeigt.

Zur Immunisierung von Mäusen wurde das Helios *Gene Gun*-System verwendet (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Die Goldpartikel ( $\varnothing$  1  $\mu\text{m}$ ) wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit DNA beschichtet. Dazu wurden jeweils 25 mg Goldpartikel mit 200  $\mu\text{g}$  DNA beladen. Die verwendete Polyvinyl-Pyrrolidon- (PVP-) Konzentration betrug

0,1 mg/ml. Die Mäuse wurden vor der Immunisierung narkotisiert (150  $\mu$ l Ketavet/Rompun intraperitoneal) und anschließend abdominal rasiert (ca. 4 cm<sup>2</sup>, Braun EP80, Braun GmbH, Kronberg). Pro Immunisierung wurden zwei nicht überlappende Schüsse mit einem Druck von 400 psi appliziert. Dies entspricht durchschnittlich einer Menge von ca. 8  $\mu$ g DNA pro Maus und Immunisierung.

### ***b) Immunisierung mit Peptid in Freund'schen Adjuvans***

Komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA, complete Freund's adjuvans, Sigma, St. Louis, MO, USA) ist ein ölhaltiges Adjuvans, das im Tierexperiment die Immunisierung verbessert, da es eine langsame Freisetzung des Antigens gewährleistet und abgetötete Mykobakterien oder deren Zellwandbestandteile (meist *Mycobacterium butyricum*) enthält, welche immunstimulatorisch wirken. Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (*incomplete Freund's adjuvans*, IFA; Sigma, St. Louis, MO, USA) enthält keine mykobakteriellen Bestandteile, besitzt aber ansonsten die gleichen Eigenschaften wie CFA. Das Antigen wurde in PBS gelöst (2 mg/ml) und mit einem Volumen CFA gründlich vermischt, so dass sich eine Emulsion bildete. Für die Zweitimmunisierung wurde das entsprechende Antigen in IFA appliziert. Pro Immunisierung wurden jeweils 100  $\mu$ l der Emulsion an drei Stellen am Rücken der Maus subkutan injiziert. Dies entspricht einer Menge von 300  $\mu$ g Antigen pro Maus und Immunisierung. Die Mäuse wurden vor der Injektion mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran-Baxter, Baxter, Lessines, Belgien) betäubt.

### ***c) Immunisierung mit rekombinanten Herpes Simplex Viren Typ 1 (rHSV-1)***

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS auf  $2 \times 10^7$  infektiöse Einheiten pro ml verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt, für 5 sec in ein Ultraschall-Wasserbad (Ultrason E, Greiner, Frickenhausen) gestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Pro Maus wurden  $2 \times 10^6$  oder  $4 \times 10^6$  pfu intravenös injiziert.

### ***d) Immunisierung mit peptidbeladenen Dendritischen Zellen***

Acht bis neun Tage nach Ansetzen einer DC-Kultur wurden die nicht adhärenen Zellen im Überstand geerntet. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen für 2 Std bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in DC-Medium mit 20  $\mu$ g/ml SIINFEKL inkubiert. In dieser Zeit verdrängt das zugegebene Peptid aufgrund seines hohen Konzentrationsüberschusses die bisher in den MHC Molekülen gebundenen Peptide, so dass nach der Inkubation überwiegend das gewünschte Peptid präsentiert wird. Die Zellen wurden dreimal gründlich mit PBS gewaschen um

ungebundenes Peptid zu entfernen und durch ein ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße 51  $\mu\text{m}$ ) filtriert. Analog wurden auch Milzzellen mit Peptid beladen. In syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse wurden  $3\text{-}4 \times 10^6$  DCs i.v. transferiert.

#### 4.2.2.11 *In-Vitro*-Kreuzpräsentationstest

CD-8-T-Zellen wurden aus OT-1-Mäusen mit dem CD8-T-Zellisolationsskit (siehe 4.2.2.15) aufgereinigt und mit CFSE gefärbt. Für den *In-Vitro*-Kreuzpräsentationstest wurden  $1 \times 10^6$  CFSE-markierte OT-1-T-Zellen mit  $4 \times 10^5$  Dendritischen Zellen oder B-Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Um eine Antigenpräsentation der Milzzellen bzw. der Dendritischen Zellen und B-Zellen zu gewährleisten und zugleich ihre Proliferation zu verhindern, wurden diese mit 1000 rad (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, Ontario, Kanada) bestrahlt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die CD8-T-Zellen mit Antikörpern gegen CD8 und CD44 gefärbt. Anschließend konnte die Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung, sowie die Expression des Aktivierungsmarkers CD44 bestimmt werden. Dieser konnte mit der Anzahl der Zellteilungen anhand der Verdünnung von CFSE korreliert werden.

#### 4.2.2.12 *In- Vivo*-Zytotoxizitätstest

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo* (Coles et al. 2002). Dieser sensitive Test basiert auf der selektiven *In-Vivo*-Eliminierung von peptidbeladenen und CFSE-markierten Milzzellen. Als interne Referenz werden Milzzellen verwendet, welche mit einer geringeren CFSE-Intensität ( $\text{CFSE}^{\text{niedrig}}$ ) markiert und so von den peptidbeladenen ( $\text{CFSE}^{\text{hoch}}$ ) Zellen durchflusszytometrisch unterscheidbar sind. Relativ zur negativen Kontrolle wird die spezifische Lyse berechnet. Es wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten präpariert und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden die Zellen in T-Zellmedium aufgenommen, in zwei Populationen aufgeteilt und bei  $37^\circ\text{C}$  für zwei Stunden mit ( $\text{OVA}_{257-264}$ ; 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder ohne Peptid inkubiert. Beide Zellpopulationen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Die peptidbeladene Hälfte wurde wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, mit einer hohen Konzentration CFSE (1,7  $\mu\text{M}$ ) angefärbt ( $\text{CFSE}^{\text{hoch}}$  Zellen). Die nicht peptidbeladenen Zellen wurden mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,2  $\mu\text{M}$ ) angefärbt ( $\text{CFSE}^{\text{niedrig}}$  Zellen). Um das im Medium enthaltene FBS (10%) zu entfernen, wurden die Zellen nach der Färbung zweimal mit PBS gewaschen. Vor der Injektion wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt. Pro Maus wurden  $10\text{-}30 \times 10^6$

Zellen i.v. injiziert. Nach 13-15 Std wurde die Milz entnommen und das Verhältnis von CFSE<sup>niedrig</sup> Zellen zu CFSE<sup>hoch</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

PSL = [1-(r von nicht immunisierter Maus/r von immunisierter Maus) × 100];

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$r = (\text{Prozentsatz CFSE}^{\text{niedrig}} / \text{Prozentsatz CFSE}^{\text{hoch}})$

### **4.2.2.13 Kultivierung von Phoenix-eco und NIH3T3-Zellen**

Phoenix-eco und NIH3T3-Zellen wurden in Phoenix-Medium auf 100 mm Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, so dass sie nie mehr als 75%-ige Konfluenz erreichten. Jeden zweiten Tag wurden sie im Verhältnis eins zu fünf auf neue Zellkulturplatten verteilt. Die Zellen wurden in 1 ml FBS mit 10% DMSO eingefroren und bei -180°C gelagert. Phoenix-eco Zellen aus dem -180 °C Lager wurden für längstens sechs Monate verwendet. Danach wurden sie für zwei Wochen mit 1 µg/ml Diphtheria-Toxin (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) und 500 µg/ml Hygromycin B (CNbiosciences LTD., Beeston, UK) reselektioniert und anschließend wieder eingefroren. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl von Phoenix-eco und NIH3T3-Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Eine Probe der Zellsuspension wurde mit Trypanblau (Gibco, 1:10 verdünnt in PBS) gemischt. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählen einer geeigneten Zellverdünnung in Trypanblaulösung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

### **4.2.2.14 Kultur von Dendritischen Zellen**

Zur Generierung von Dendritischen Zellen aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen, wurden Knochenmarkszellen einer unbehandelten Maus in einer Konzentration von 5x10<sup>6</sup> Zellen/10 ml in DC-Kulturmedium aufgenommen und in einer 100 mm Zellkulturschale bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach drei Tagen wurde pro Platte 5 ml frisches DC-Kulturmedium zugegeben. Acht bis neun Tage nach Ansetzen der Kultur wurden die nicht adhären DCs aus dem Überstand geerntet.



#### 4.2.2.15 Kultur von HSPC

Zur Gewinnung von HSPC wurden 150 mg/kg Körpergewicht 5-Fluoro-Uracil (5-FU, Amersham, Little Chalfont, UK) i.v. gegeben. 5-FU ist ein Pyrimidin-Analog und inhibiert die Thymidilat-Synthase. Daher wirkt es zell-zyklusspezifisch (S-Phase) und führt zu Anreicherung der sich langsam oder nicht teilenden Stammzellpopulation. Die aus dem Knochenmark beider Ober- und Unterschenkel präparierten Zellen wurden in HSPC-Medium ( $10 \times 10^6$  Zellen/10 ml) resuspendiert und in einer 100 mm Zellkulturschale bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für drei Tage inkubiert. Das HSPC-Medium enthielt rekombinantes Interleukin-6 (hIL-6, 200U/ml), murines Interleukin-3 (mIL-3, 10ng/ml) und murinen Stammzellfaktor (mSCF, 50ng/ml); ein Wachstumsfaktorcocktail, der die weitere Differenzierung der Stamm- und Vorläuferzellen verhindert und diese Zellen zur Proliferation anregt. Die Stammlösung von hIL-6 sollte nicht älter als sechs Monate sein. Die rekombinanten Wachstumsfaktoren stammten von Strathmann Biotech, Hannover.

#### 4.2.2.16 Magnetische Zellseparation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Separation von Zellen mit Antikörpern, welche an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird. Die magnetisch markierten Zellen werden dadurch in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen passieren. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wird, können die magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluiert werden. Es können prinzipiell zwei Isolationsstrategien verfolgt werden: a) direkte Isolierung, d.h. die gewünschte Zellpopulation wird mit Antikörpern markiert und auf der Säule zurückgehalten oder b) negative Isolierung, d.h. alle unerwünschten Zellen werden markiert und zurückgehalten. In dieser Arbeit wurden beide Strategien angewendet. B-Zellen wurden mit CD19-Microbeads und Dendritische Zellen mit CD11c-Microbeads isoliert. OT-1-T-Zellen wurden entweder positiv mit CD8-Microbeads oder negativ mit dem CD8-T-Zellisolationskit aufgereinigt. Ly5.2-positive Zellen wurden über einen FITC-markierten monoklonalen  $\alpha$ -Ly5.2 Antikörper markiert und mit FITC-Microbeads depletiert. Es wurden nur entgaste Puffer verwendet. Aus Milz und Lymphknoten gewonnene Einzelzellsuspensionen wurden mit den vom Hersteller angegebenen Mengen an Microbeads und MACS-Puffer für die empfohlene Zeit bei 4-8°C inkubiert. Die Zellen wurden mit dem 20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen. Um Zellaggregate zu entfernen wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße 51  $\mu$ m) filtriert, bevor sie

auf die (gemäß den Angaben des Herstellers equilibrierte) Säule gegeben wurden. Maximal  $2 \times 10^8$  Zellen pro  $500 \mu\text{l}$  wurden auf die Säule aufgetragen, welche in einem Magneten befestigt war. Für die positive Selektion von bis zu  $10 \times 10^6$  bzw.  $100 \times 10^6$  Zellen wurde eine  $\text{MS}^+$ - bzw.  $\text{LS}^+$ -Säule verwendet. Die Zellen wurden mit  $3 \times 500 \mu\text{l}$  bzw.  $3 \times 3 \text{ ml}$  MACS-Puffer für  $\text{MS}^+$ - bzw.  $\text{LS}^+$ -Säulen gewaschen. Die passierenden Zellen wurden als negative Fraktion gesammelt. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die auf der Säule zurückgehaltenen Zellen als positive Fraktion mit  $2 \times 500 \mu\text{l}$  bzw.  $2 \times 3 \text{ ml}$  MACS-Puffer eluiert.

### **4.2.2.17 Messung der Zellproliferation *in vitro***

OT-1-TCR-transgene T-Zellen wurden mit CD8-Microbeads oder mit dem CD8-T-Zellisoliationskit aufgereinigt (siehe 4.2.2.16). Anschließend wurden die Zellen mit  $12 \mu\text{M}$  CFSE gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Volumen T-Zellmedium gestoppt.  $0,75 \times 10^5$  gefärbte OT-1 Zellen wurden mit  $2 \times 10^6$  peptidbeladenen (siehe Immunisierung mit peptidbeladenen DCs) Milzzellen bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  stimuliert. Um eine Antigenpräsentation der Milzzellen zu gewährleisten und zugleich ihre Proliferation zu verhindern, wurden diese mit  $1000 \text{ rad}$  (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, Ontario, Kanada) bestrahlt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die OT-1-T-Zellen mit Antikörpern gegen CD8 gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen für CD44, CD62L, CD25, CD69, CD5 oder  $\text{IFN-}\gamma$  gefärbt. Anschließend konnte die Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung, sowie die Expression der Aktivierungsmarker und die Produktion von  $\text{IFN-}\gamma$  bestimmt werden. Diese konnten mit der Anzahl der Zellteilungen anhand der Verdünnung von CFSE korreliert werden.

### **4.2.2.18 Proteintransfer und Proteindetektion auf einer PVDF-Membran, (Western-Blot)**

Um ein Protein mit Hilfe einer spezifischen Antikörperbindung messen zu können, muss es zunächst von der SDS-Page auf eine Membran transferiert werden.

Dazu wurde eine Transferapparatur von BIO-RAD, Hercules, CA, USA verwendet. Die Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF-Membran, Millipore, Bedford, MA, USA) wurde für 2 min in  $100\%$ -igen Methanol getaucht und anschließend mit Transferpuffer gespült. Es wurde ein Sandwich aus einem im Transferpuffer getränkten Schwamm, zwei Lagen saugfähigem Papier (Schleicher&Schuell, Dassel), der PVDF-Membran, dem Gel, erneut zwei Lagen saugfähigem Papier und Schwamm so in die Transferapparatur eingespannt, dass sich die mit der Membran belegte Seite des Gels auf der Pluspolseite befand. Der Transfer wurde

bei 70 Volt Spannung, für 1,5 Std und auf Eis im Transferpuffer durchgeführt. Die Banden der Markerproteine auf der Membran wurden mit einem Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran kurz in PBS getaucht und unter Schütteln (Heidolph, Schwabach) über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für je 10 min mit 10 ml Antikörperfärbelösung gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechend vorverdünnten primären Antikörper erfolgte für 1,5 Std bei 4°C und milder Agitation. Die Membran wurde anschließend dreimal für je 10 min mit 10 ml Antikörperfärbelösung gewaschen und mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper für 1,5 Std bei 4°C und milder Agitation inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 10 ml Antikörperfärbelösung gewaschen, mit ECL-Lösung (Amersham Pharmacia) bedeckt und für 1 min ruhend inkubiert. Die Membran wurde in Lebensmittel-Frischhaltefolie (Roth, Karlsruhe) eingeschlagen und mit einem Film (Tycon Medical Systems, Burgdorf, CH) in eine Kassette eingelegt. Die Expositionszeit wurde jeweils empirisch ermittelt und betrug zwischen 1 bis 20 min. Der exponierte Film wurde in einem Automaten (Protec, Oberstenfeld) entwickelt.

#### **4.2.2.19 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)**

##### ***a) Herstellung der Zellysate***

Die zu lysierenden Zellen wurden in 500  $\mu$ l eiskalten Lysepuffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen suspendiert, sofort gevortext und für 15 min unter gelegentlichem Vortexen auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 4°C in der Tischzentrifuge (maximale Geschwindigkeit) pelletiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

##### ***b) SDS-PAGE***

Diese Art der Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen anhand ihres Migrationsverhaltens in der Gelmatrix, wobei kleine Proteine schneller wandern als große. Es wurde eine SDS-PAGE Apparatur von BIO-RAD Hercules, CA, USA verwendet. Für ein 12%-iges Trenngel wurden 5 ml Trenngelpuffer, 8 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Rotiphorese Gel-30, Roth) und 6,6 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l 10%-igem Ammoniumpersulfat (w/v) und 8  $\mu$ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) wurden zwei Gele gegossen und in der Kammer mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Wasser durch Dekantieren entfernt. Für das 5%-ige Sammelgel wurden 1,35 ml Sammelgelpuffer, 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung und 6,8 ml H<sub>2</sub>O

gemischt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  10% Ammoniumpersulfat (w/v) und 10  $\mu\text{l}$  TEMED wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm plaziert. 20  $\mu\text{l}$  Lysat wurden mit 5  $\mu\text{l}$  5 $\times$ Ladepuffer (Lämmli) vermischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und in einen vom Probenkamm ausgeformten Auftragsschlitz gegeben. Als Größenmarker wurde der *FullRangeRainbow* Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham, Little Chalfont, UK) verwendet. Eventuell ungenützte Auftragsschlitze im Gel wurden mit 1 $\times$ Ladepuffer aufgefüllt, um die Gleichmäßigkeit der Probenmigration zu gewährleisten. Die Elektrophorese wurde im Laufpuffer bei 100 Volt Spannung und Raumtemperatur im Laufpuffer durchgeführt. Die Dauer richtete sich nach der zu erwartenden Größe des zu detektierenden Proteins und betrug in etwa 1,5 - 2 Std.

### **4.2.2.20 Statistik**

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (Student's *t*-Test oder Mann-Whitney Test) wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2001 oder SPSS berechnet.

### **4.2.2.21 Transduktion von HSPC**

Vier Tage nach Injektion von 5-FU wurde das Knochenmark aus beiden Ober- und Unterschenkeln isoliert und in HSPC-Medium vorstimuliert. Nach drei Tagen wurden die HSPC mit einem Zellschaber geerntet, gezählt und mit zellfreien Vektorüberständen und 4  $\mu\text{g/ml}$  Polybrene gemischt. Es wurden zwischen 3 und  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml Vektorüberstand eingesetzt und durch Spin-Infektion in 6-Lochplatten transduziert. Dazu wurden die 6-Lochplatten mit Parafilm umwickelt und für 2 Std bei 32°C mit 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten für weitere vier Stunden bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Vektorüberstände mit dem darin enthaltenen Polybrene durch HSPC-Medium ersetzt und die Zellen bei 37°C im Brutschrank weiterkultiviert. Alternativ wurde die Transduktion ein- oder zweimal wiederholt, wobei zwischen den einzelnen Transduktionen mindestens 14 Stunden lagen. Am Tag nach der letzten Transduktion wurden die Zellen durch kräftiges Abspülen mit Dulbecco's PBS (kein  $\text{Ca}^{2+}$ , kein  $\text{Mg}^{2+}$ ) geerntet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Einfluss eines posttranskriptionell regulatorischen Elements auf SIN-Vektoren

Um einen retroviralen Vektor für einen effizienten Gentransfer und eine gezielte Transgenexpression in B-Zellen zu entwickeln, sollte ein SIN-Vektor mit einem heterologen B-zellspezifischen Promotor verwendet werden.

Das posttranskriptionell regulatorische Element des Hepatitis Virus des Waldmurmeltiers, WPRE, wird oft in Kombination mit lentiviralen und gammaretroviralen Vektoren verwendet, um die Expression eines Transgens zu erhöhen (Moreau-Gaudry et al. 2001; Ramezani et al. 2000; Schambach et al. 2000; Schwenter et al. 2003; Zufferey et al. 1999). Während die Verwendung von WPRE in Zusammenhang mit gammaretroviralen LTR-Vektoren zu einer geringfügigen Erhöhung des Titers führte (Schambach et al. 2000), traf dies für lentivirale SIN-Vektoren nicht zu (Donello et al. 1998; Mautino and Morgan 2002). Daher sollte zuerst systematisch der Einfluss von WPRE auf den viralen Titer und die Transgenexpression eines gammaretroviralen SIN-Vektors mit einem ubiquitären oder zellspezifischen Promotor analysiert werden. Hierzu wurde ein SIN-Vektor mit (SIN-SF-W) und ohne (SIN-SF) WPRE verwendet (Abb. 7).

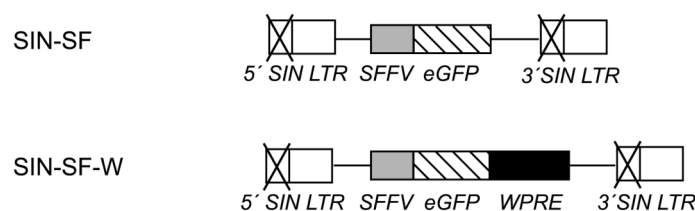


Abb. 7: Schematische Darstellung der gammaretroviralen SIN-Vektoren mit ubiquitärer Transgenexpression. Gezeigt ist ein SIN-Vektor mit und ohne WPRE, in welchem die Transgenexpression (eGFP) unter Kontrolle des SFFV-Promotors steht. Die Darstellung bezieht sich auf den Aufbau der Vektoren nach der Integration ins Wirtsgenom.

In beiden Vektoren steht die Transgenexpression unter Kontrolle des ubiquitären Promotor- und Enhancer-Elements des *Spleen Focus-Forming Virus* (SFFV), welches ein gutes Expressionsprofil in allen Entwicklungsstadien und Zellreihen des hämatopoetischen Systems zeigt (Baum et al. 1995). Somit kann der Einfluss von WPRE auf die Transgen-Expression

nicht nur in B-Zellen, sondern auch in anderen Zellen des Immunsystems analysiert werden. Als Reportergen wurde das verstärkt grün fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) verwendet, welches die Detektion einzelner Zellen *in vitro* und *in vivo* ermöglicht.

Um den viralen Titer der Vektoren SIN-SF-W und SIN-SF zu ermitteln, wurden NIH3T3-Zellen mit seriellen Verdünnungen der respektiven Vektorüberstände transduziert. Anhand des Prozentsatzes eGFP-positiver Zellen wurde dann der Titer bestimmt. Ein direkter Vergleich des viralen Titers beider Vektoren zeigte, dass der Titer durch die Verwendung des posttranskriptionell regulatorischen Elements bis zu 14-fach erhöht wurde (Abb. 8a, ein Experiment von drei unabhängig durchgeführten ist gezeigt). Die Titer lagen für SIN-SF-W in drei unabhängig durchgeführten Experimenten bei  $3,5 - 18,9 \times 10^5$  TU/ml gegenüber  $0,6 - 2,8 \times 10^5$  TU/ml für den Vektor ohne WPRE ( $p=0,003$ ).

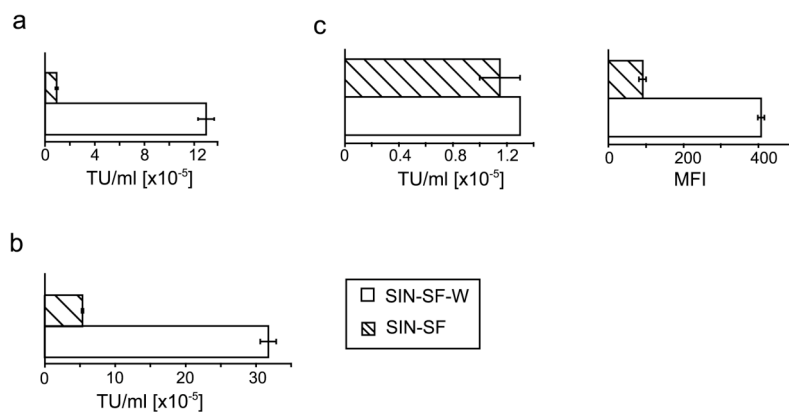


Abb. 8: Bestimmung des Titers und der Transgenexpression der SFFV-SIN-Vektoren in NIH3T3-Zellen. NIH3T3-Zellen wurden mit Vektorüberständen von SIN-SF-W und SIN-SF transduziert. a) Der virale Titer von SIN-SF-W- und SIN-SF-Vektorüberständen wurde 48 Stunden nach der Transduktion anhand der Frequenz eGFP-exprimierender Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (ein Experiment von drei unabhängig durchgeführten ist gezeigt). b) Der virale Titer von SIN-SF-W- und SIN-SF-Vektorüberständen wurde 48 Stunden nach der Transduktion über eine quantitative PCR für eGFP bestimmt. Die Daten stammen aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. c) Die Vektorüberstände wurden vor der Transduktion normalisiert, wie anhand des viralen Titers (linker Graph) der Vektorüberstände zu erkennen ist. Der rechte Graph zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität eGFP-positiver NIH3T3-Zellen 48 Stunden nach der Transduktion, welche mit den normalisierten Vektorüberständen von SIN-SF und SIN-SF-W transduziert worden waren. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Der beobachtete höhere Virustiter für den Vektor mit WPRE könnte auch auf einer verbesserten Transgenexpression des viralen Vektors und nicht auf einer erhöhten Kopienzahl

des viralen Genoms in den transduzierten Zellen beruhen. Daher wurde der virale Titer beider Vektoren mittels quantitativer PCR und somit direkt die Anzahl der integrierten Vektorkopien in NIH3T3-Zellen (Abb. 8b) bestimmt. Der Titer des Vektors mit WPRE war im Vergleich zum Vektor ohne WPRE durchschnittlich sechsfach erhöht ( $31,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$  TU/ml gegenüber  $5,4 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$ ,  $p=0,0002$ ).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Titerbestimmung mittels quantitativer PCR und Durchflusszytometrie ließen vermuten, dass WPRE auch die Transgenexpression erhöht. Um den Einfluss von WPRE auf die Genexpression zu bestimmen, muss die Transduktion unter identischen Bedingungen ablaufen, d.h. das Verhältnis von infektiösen viralen Partikeln zu Zielzellen (*multiplicity of infection*, MOI) muss gleich sein. Nur so kann ein Mischeffekt ausgeschlossen werden, der aus einer erhöhten Transgenexpression und Anzahl viraler Genome in der Zielzelle resultiert. Daher wurden NIH3T3-Zellen mit normalisierten Vektorpräparationen transduziert, so dass der virale Titer dieser Überstände wie erwartet nahezu identisch war (Abb. 8c, linker Graph; SIN-SF-W  $1,3 \times 10^5 \pm 0$  TU/ml gegenüber SIN-SF  $1,1 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$  TU/ml). Über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eGFP-positiver Zellen kann auf die durchschnittliche Höhe der Transgen-Expression geschlossen werden. Ein Vergleich der MFI von eGFP-positiven NIH3T3-Zellen (Abb. 8c, rechter Graph) ergab, dass WPRE die Transgen-Expression in NIH3T3-Zellen vierfach erhöhte. Diese Daten zeigen, dass WPRE sowohl den viralen Titer als auch die Transgenexpression in NIH3T3-Zellen erhöht.

Als nächstes wurde der Einfluss von WPRE auf die Transgen-Expression in lymphoiden und myeloiden Zellen *in vivo* untersucht. Dazu wurden Knochenmarkschimären generiert. C57BL/6-Donoren wurden mit 5-FU injiziert, welches toxisch für alle teilenden Zellen ist und so den Anteil hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPC) im Knochenmark erhöht. Die HSPC wurden aus dem Knochenmark gewonnen und *ex vivo* dreimal mit normalisierten Vektorüberständen von SIN-SF-W und SIN-SF (MOI 0,2-0,3) transduziert. Anschließend wurden diese zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems von letal bestrahlten syngeneten Mäusen verwendet. Um potentielle toxische Effekte auszuschließen, welche durch eine hohe Transgen-Expression und einen damit verbundenen Selektionsdruck bedingt sein könnten, wurde eine zusätzliche Gruppe mit HSPC transplantiert, die mit Vektorüberständen von SIN-SF-W unter hohen MOI-Bedingungen (MOI 3-4) transduziert worden waren. Als Kontrolle für die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems diente eine Gruppe, welcher HSPC injiziert wurden, die mit virusfreiem Medium transduziert worden waren. Von Woche sechs bis 24 nach der

Transplantation der HSPC wurde die eGFP-Expression in B-Zellen, T-Zellen und myeloiden Zellen des peripheren Blutes mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Frequenz der analysierten Zellpopulationen im Blut war für alle Gruppen ähnlich (Daten nicht gezeigt), was auf eine normale Rekonstitution des lymphoiden und myeloiden Repertoires der Empfänger virusmodifizierter HSPC schließen ließ. In Woche sechs bis 24 exprimierten durchschnittlich  $80 \pm 4\%$  der B-Zellen,  $76 \pm 6\%$  der T-Zellen und  $90 \pm 2\%$  der myeloiden Zellen eGFP, wenn die Transduktion mit einer hohen MOI durchgeführt worden war (Abb. 9).

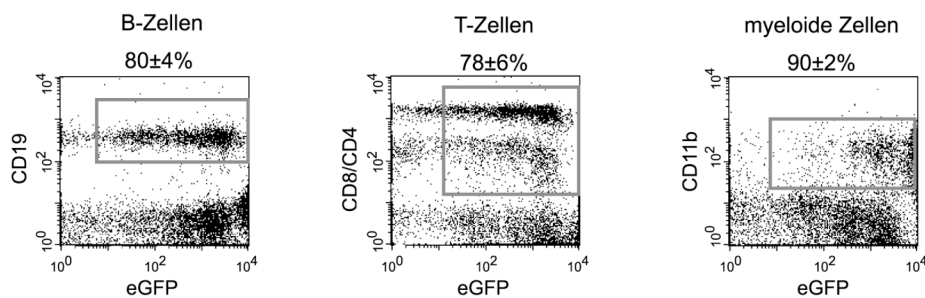


Abb. 9: Bestimmung der Frequenz transgenexprimierender hämatopoetischer Zellen *in vivo*. Primäre HSPC wurden dreimal mit SIN-SF-W mit einer hohen MOI (MOI=3-4) transduziert und in letal bestrahlte syngene Rezipienten (n=4) transplantiert. Sechs bis 24 Wochen nach der Transplantation wurde die Frequenz eGFP-positiver B-Zellen, T-Zellen und myeloider Zellen im Blut durchflusszytometrisch analysiert (die Durchschnittswerte dieses Zeitraums sind angegeben). B-Zellen, T-Zellen bzw. myeloide Zellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD19, CD4 und CD8 bzw. CD11b identifiziert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

Wurde hingegen die Transduktion mit einer niedrigen MOI und normalisierten Vektorüberständen von SIN-SF und SIN-SF-W durchgeführt, so exprimierte in beiden Gruppen im untersuchten Zeitraum ein durchschnittlich fast identischer Anteil der Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen und myeloiden Zellen eGFP (Tabelle 2). Dies belegt, dass beide Gruppen unter identischen Bedingungen transduziert worden waren.



Zelltyp	% eGFP <sup>+</sup> Zellen	
	pSIN-SF-W	pSIN-SF
Lymphozyten	20,1±4,3	24,5±2,9
B-Zellen	23,5±4,8	24,3±4,5
T-Zellen	19,2±3,6	19,8±2,9
myeloide Zellen	38,1±7,6	44,1±6,7

Tabelle 2. Vergleich der Frequenz eGFP-exprimierender hämatopoetischer Zellen in pSIN-SF und pSIN-SF-W Knochenmarkschimären. HSPC wurden dreimal mit normalisierten Vektorüberständen (MOI 0,2-0,3) von SIN-SF (n=6) und SIN-SF-W (n=4) transduziert und in letal bestrahlte syngene Rezipienten transplantiert. Die Frequenz eGFP-exprimierender Lymphozyten, B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) und myeloider Zellen (CD11b<sup>+</sup>) des peripheren Bluts wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es ist der Durchschnittswert für die Messungen von Woche 6, 7, 11, 14, 18 und 24 angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

Folglich kann anhand eines direkten Vergleichs der MFI von eGFP-positiven Zellen in beiden Gruppen auf eine unterschiedliche Transgenexpression geschlossen werden. Dem Vergleich wurde der Durchschnittswert der Messungen von Woche sechs bis 24 für die einzelnen Vektoren und Zellpopulationen zugrunde gelegt (Tabelle 3).

Zelltyp	MFI der eGFP <sup>+</sup> Zellen	
	pSIN-SF-W	pSIN-SF
myeloide Zellen	994 ± 183	1091 ± 125
B-Zellen	370 ± 153	763 ± 100
T-Zellen	284 ± 67	404 ± 98
Lymphozyten	554 ± 132	879 ± 213

Tabelle 3: Einfluss von WPRE auf die Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen *in vivo*. Primäre HSPC wurden dreimal mit normalisierten Vektorüberständen von SIN-SF-W (n=4) und SIN-SF (n=6) mit einer MOI von 0,2-0,3 transduziert und in letal bestrahlte syngene Rezipienten transplantiert. Es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität eGFP-positiver myeloider Zellen (CD11b<sup>+</sup>), B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) und Gesamtlmphozyten im Blut durchflusszytometrisch analysiert. Der Durchschnittswert für die Messungen von Woche 6, 7, 11, 14, 18 und 24 ist angegeben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

In myeloiden Zellen führte die Verwendung von WPRE zu keiner erhöhten Transgenexpression *in vivo*, wogegen SIN-SF-W-transduzierte B-Zellen (p<0,001) und T-

Zellen ( $p < 0,05$ ) eine signifikant geringere Transgenexpression aufwiesen. Dieser Effekt spiegelte sich auch auf Ebene aller Lymphozyten wieder ( $p = 0,02$ ). Eine Analyse der B- und T-Zellen in der Milz (Daten nicht gezeigt) bestätigte die Ergebnisse der Blutanalyse; WPRE führte zu einer signifikant geringeren Transgen-Expression in B-Zellen ( $p = 0,008$ ) und T-Zellen ( $p < 0,05$ ). In der Gruppe, welche mit einer hohen MOI transduziert wurde, blieb der Anteil eGFP-positiver Zellen und deren MFI (Daten nicht gezeigt) über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstant. Es konnte auch in keiner der untersuchten hämatopoetischen Populationen ein selektiver Verlust der Zellen mit hoher eGFP-Expression beobachtet werden. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass ein negativer Selektionsdruck in B-Zellen und T-Zellen für die beobachtete schwächere Transgenexpression von SIN-Vektoren mit WPRE verantwortlich ist.

Aus diesen Daten geht hervor, dass der Einfluss von WPRE auf die Transgenexpression stark vom zellulären Kontext abhängt. Während WPRE die Transgenexpression in Fibroblasten (NIH3T3) erhöht, wird diese in myeloiden Zellen nicht beeinflusst bzw. in lymphoiden Zellen sogar erniedrigt.

## **5.2 Entwicklung eines SIN-Vektors mit B-zellspezifischer Transgen-Expression**

Um die Transgenexpression des SIN-Vektors auf B-Zellen zu beschränken, wurde das ubiquitäre Promotor/Enhancer-Element des SFFV durch ein Fragment aus der Promoter-Region des humanen CD19-Gens (Kleindienst et al. 2000) ersetzt (Abb. 10). Die regulatorische Sequenz des CD19-Gens wurde bisher nur ungenau untersucht: transgene Modelle identifizierten diese 5' von der kodierenden Sequenz in einem genomischen Fragment von 4,2 bis 6,3 kb (Kleindienst et al. 2000; Maas et al. 1999; Zhou et al. 1994). Da in retroviralen Vektoren nur etwa 5 kb für das Transgen und regulatorische Sequenzen zur Verfügung stehen, wurde eine Sequenz von 999 bp (-1018 bis -19 bp) ausgewählt. Für das CD19-Gen sind mehrere Transkriptionsstartpunkte bekannt, die 5' vom Startcodon in einer Region von 100 bp liegen (Kozmik et al. 1992; Zhou et al. 1994; siehe auch Abb. 6 in 4.1.7.4). Der Promotor besitzt keine TATA-Box, enthält aber Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie das B-zellspezifische Aktivator Protein (*B cell-specific activator protein*, BSAP) und den frühen B-Zellfaktor (*early B-cell factor*, EBF). Von diesen Transkriptionsfaktoren wird angenommen, dass sie die B-zellspezifische Expression von CD19 regulieren (Gisler et al. 1999; Kozmik et al. 1992).

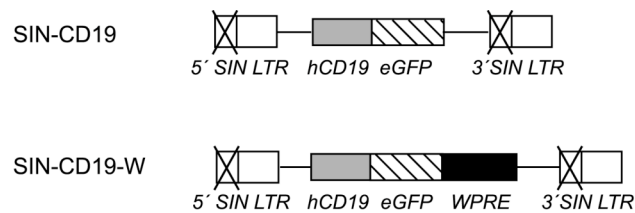


Abb. 10: Schematische Darstellung der SIN-Vektoren mit humanem CD19-Promotor. Gezeigt ist ein SIN-Vektor mit und ohne WPRE, in welchem die Transgenexpression (eGFP) unter Kontrolle des humanen CD19-Promotors steht. Die Darstellung bezieht sich auf den Aufbau der Vektoren nach der Integration ins Wirtsgenom.

Der Vektor wurde aus zwei Gründen mit und ohne WPRE konstruiert: die Daten des SIN-Vektors mit dem Promotor/Enhancer-Element des SFFV wiesen darauf hin, dass WPRE essentiell für einen ausreichend hohen viralen Titer des SIN-Vektors mit dem humanen CD19-Promotor sein würde. Ferner konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete negative Einfluss von WPRE auf die Transgenexpression in lymphoiden Zellen abhängig von der Art des verwendeten Promotors im SIN-Vektor ist.

Der Titer für die SIN-Vektoren mit dem CD19-Promotor konnte nicht über die Transduktion einer B-Zelllinie bestimmt werden, da keine Zelllinie gefunden werden konnte, welche CD19 exprimierte und zugleich gut transduzierbar war. Aus diesem Grund wurde der virale Titer für SIN-CD19 und SIN-CD19-W auf NIH3T3-Zellen bestimmt, indem die Anzahl der Vektorkopien pro Genom über eine quantitative PCR bestimmt wurde (Abb. 11a). Analog zu SIN-SF und SIN-SF-W, war der Titer des WPRE-Vektors mit  $10,7 \times 10^5 \pm 4,3 \times 10^5$  für SIN-CD19-W und  $5,2 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$  für SIN-CD19 im Durchschnitt zweifach erhöht ( $p=0,02$ ).

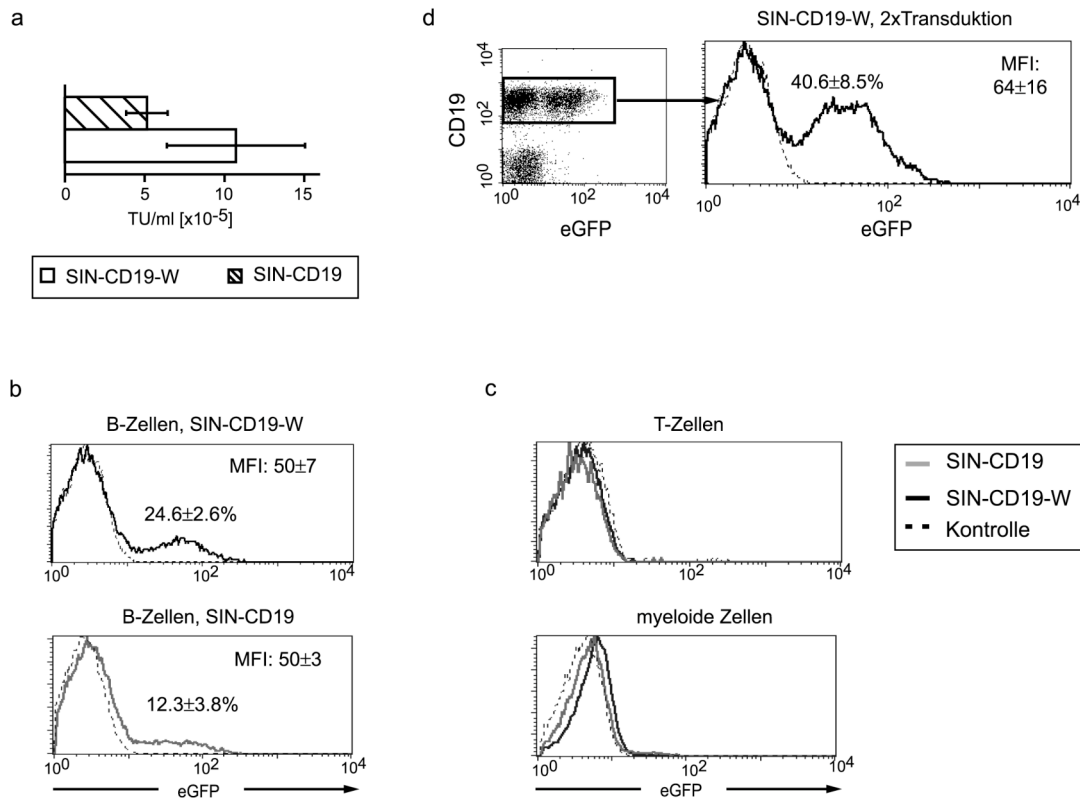


Abb. 11: Titer der SIN-Vektoren mit humanem CD19-Promotor und Expressionsprofil der Vektoren in Knochenmarkschimären. a) NIH3T3-Zellen wurden mit Vektorüberständen von SIN-CD19-W und SIN-CD19 transduziert. Der virale Titer wurde 48 Stunden nach der Transduktion mittels quantitativer PCR für eGFP bestimmt. Die Daten stammen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. TU/ml=transduzierende Einheit pro ml. b), c) HSPC wurden einmal mit Vektorüberständen von SIN-CD19-W und SIN-CD19 (je  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Vektorüberstand) transduziert und Knochenmarkschimären (je  $n=4$ ) generiert. Vier bis fünf Wochen später wurde die Frequenz eGFP-exprimierender Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Die Histogramme sind für (b) B-Zellen ( $CD19^+$ ), (c) T-Zellen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ ) und myeloide Zellen ( $CD11b^+$ ) dargestellt. d) Die HSPC wurden zweimal mit SIN-CD19-W transduziert ( $n=3$  und  $n=2$ , die Ergebnisse stammen aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären). Fünf Wochen nach Transplantation der HSPC wurde die Frequenz eGFP-positiver Zellen im peripheren Blut der Knochenmarkschimären durchflusszytometrisch analysiert. Das Punktwolkendiagramm bzw. Histogramm zeigt die Gesamtlymphozyten bzw. CD19-positive B-Zellen. Der Prozentsatz eGFP-positiver B-Zellen und die respektive mittlere Fluoreszenzintensität sind in allen Histogrammen angegeben.

Um zu untersuchen, ob ein erhöhter Titer auch mit einer erhöhten Frequenz transgenexprimierender B-Zellen *in vivo* korrelierte, wurden die HSPC einmal mit den entsprechenden Vektorüberständen transduziert. Vier bis fünf Wochen nach der Transplantation der HSPC wurde die eGFP-Expression in B-Zellen, T-Zellen und myeloiden Zellen des peripheren Blutes durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 11b). Wie aus den Ergebnissen der quantitativen PCR zu erwarten war, wurden 50% weniger eGFP-exprimierende Zellen für den Vektor ohne WPRE gefunden. Ein Vergleich der MFI von

eGFP-positiven Zellen beider Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied auf. CD19-negative Zellen, wie T-Zellen und myeloide Zellen, zeigten für beide Vektoren im Vergleich zur Kontrolle keine eGFP-Expression (Abb. 11c). Somit konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung eines 999-bp-großen Fragments des humanen CD19-Promotors eine B-zellspezifische Transgenexpression *in vivo* erreicht werden kann. Analog zum Vektor mit dem viralen Promotor steigert WPRE auch den Titer dieses SIN-Vektors, was in einer erhöhten Frequenz transgenexprimierender B-Zellen *in vivo* resultiert.

Der B-zellspezifische Vektor mit WPRE (SIN-CD19-W) wurde für alle weiteren Experimente ausgewählt, da der virale Titer höher als der des entsprechenden Vektors ohne WPRE war und kein Unterschied für die Transgenexpression in B-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die fast identische MFI in beiden Gruppen (Abb. 11b) schließt jedoch nicht aus, dass die Transgenexpression analog zu SIN-SF-W für SIN-CD19-W in B-Zellen etwas erniedrigt ist, was durch einen höheren Virustiter und damit einer potentiell erhöhten Anzahl integrierter retroviraler Genome kompensiert würde. Um die Frequenz transgenexprimierender B-Zellen *in vivo* zu erhöhen, wurden die zur Rekonstitution verwendeten HSPC zweimal mit Vektorüberständen von SIN-CD19-W transduziert. Im Durchschnitt wurden  $40,6 \pm 8,5\%$  eGFP-positiver B-Zellen im peripheren Blut vier bis fünf Wochen nach der Transplantation der transduzierten HSPC gemessen (Abb. 11d, Histogramm). In der CD19-negativen Population wurde eine nur marginale eGFP-Expression gefunden (Abb. 11d, Dot Plot). Die mittlere Fluoreszenzintensität war im Vergleich zur entsprechenden einmal transduzierten Gruppe nicht signifikant erhöht (vgl. Abb. 11b und d). Dies lässt vermuten, dass die Anzahl integrierter Vektorkopien durch die zweifache Transduktion nicht oder nur sehr wenig erhöht worden war.

Die Mäuse der zweimal transduzierten Gruppe wurden fünf oder zehn Wochen nach der Transplantation analysiert. Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen aus Knochenmark und Milz wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Frequenz transgenexprimierender B-Zellen und die Höhe der Transgenexpression untersucht (Abb. 12). Im Knochenmark und in der Milz wurde eine vergleichbare Frequenz eGFP-exprimierender Zellen in allen Stadien der B-Zellentwicklung festgestellt, welche CD19 exprimieren (Abb. 12). Auch in  $29,2 \pm 8,4\%$  der peritonealen B-1-B-Zellen wurde eine eGFP-Expression gemessen (Daten nicht gezeigt). Die in den Histogrammen angegebenen Werte spiegeln die Durchschnittswerte aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären wieder. Die große Varianz geht vermutlich auf die unterschiedliche Beteiligung transduzierter und untransduzierter HSPC bei der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zurück. Die

MFI als Maß für die Transgenexpression zeigte für die untersuchten B-Zellpopulationen keine deutlichen Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt).

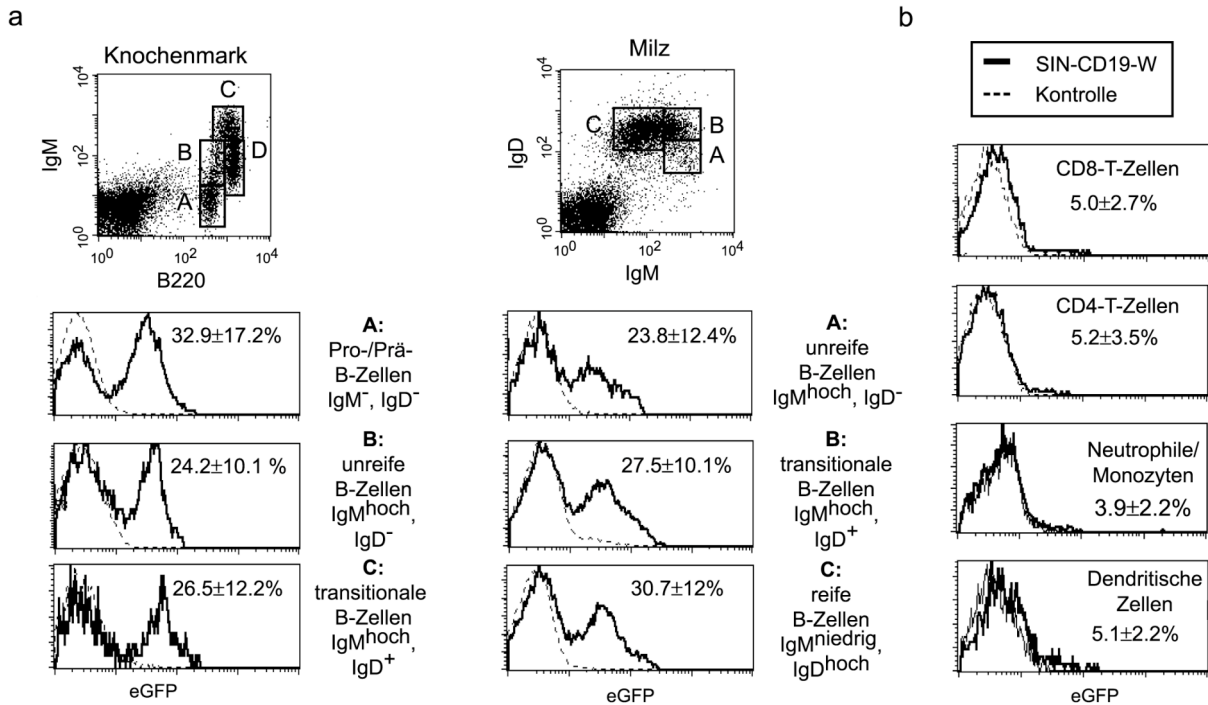


Abb. 12: Expressionsprofil von SIN-CD19-W während der B-Zellentwicklung in Knochenmark und Milz. Die in Abb. 11d gezeigten SIN-CD19-W Knochenmarkschimären wurden fünf oder zehn Wochen nach Transplantation der HSPC getötet. a) Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der B-Zellen wurden, wie in den repräsentativen Punktwolkendiagrammen gezeigt, anhand ihrer differentiellen Expression von B220, IgM und IgD identifiziert. Die IgD-Färbung im Knochenmark bzw. B220-Färbung in der Milz ist nicht gezeigt. Die Histogramme sind für die rechtsseitig beschriebenen B-Zellsubpopulationen dargestellt. b) Die Frequenz eGFP-exprimierender CD19-negative Zellen in der Milz wurde analysiert. Die Histogramme sind für T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>), Neutrophile/Monozyten (Ly6G<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>) und Dendritische Zellen (CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>b+</sup>) gezeigt. Die Frequenz transgenexpmierender Zellen ist in allen Histogrammen angegeben. Die Ergebnisse stammen aus zwei Experimenten mit unabhängigen Knochenmarkschimären.

Eine Erhöhung der Frequenz transgener B-Zellen *in vivo* durch eine mehrmalige Transduktion der HSPC kann mit einer Erhöhung der Kopienzahl integrierter Vektorsequenzen assoziiert sein. Dies wiederum kann zu einer unspezifischen Transgenexpression von ansonsten zell- oder gewebsspezifischen Promotoren führen. Daher wurden neben den einzelnen Entwicklungsstadien der B-Zellen in Knochenmark und Milz, auch die CD19-negativen Zellpopulationen der Milz auf ihre eGFP-Expression untersucht (Abb. 12b). Es wurde eine nur sehr schwache eGFP-Expression in wenigen T-Zellen, Neutrophilen/Monozyten und Dendritischen Zellen gemessen. Wurden hingegen die HSPC ein drittes Mal transduziert,

fürte dies zu einer signifikanten Population CD19-negativer, eGFP-exprimierender Zellen (Abb. 13). Im Vergleich zur Zweifach-Transduktion erhöhte sich nur die Frequenz transgenexprimierender T-Zellen und Nicht-B-/Nicht-T-Zellen (vgl. Abb. 13, Abb. 12b und Abb. 11d). Dies lässt vermuten, dass durch eine dritte Transduktion die Anzahl der retroviralen Kopien pro Zelle aber nicht die Häufigkeit der transduzierten Zellen erhöht wird. Es wurde gezeigt, dass die Frequenz transgenexprimierender B-Zellen durch mehrmaliges Transduzieren der HSPC gesteigert werden kann, wobei dies mit einem erhöhten Auftreten einer unspezifischen Transgenexpression verbunden ist. Durch die Verwendung von SIN-CD19-W kann die Transgenexpression zu einem ähnlichen Prozentsatz und in einer vergleichbaren Expressionshöhe in alle CD19-positive Entwicklungsstadien der B-Zellentwicklung in Knochenmark und Milz dirigiert werden.

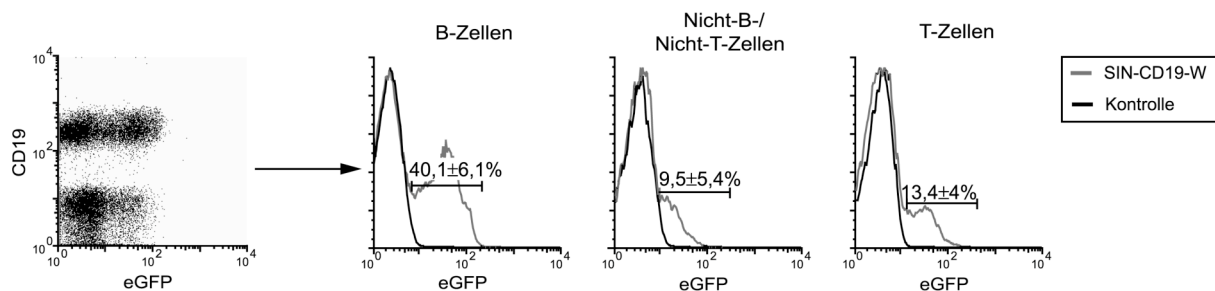


Abb. 13: Bestimmung der Frequenz eGFP-positiver Zellen in Knochenmarkschimären mit einer Dreifach-Transduktion. HSPC wurden dreimal mit SIN-CD19-W-Vektorüberständen transduziert und in syngene letal bestrahlte Rezipienten transplantiert (n=9). Zehn Wochen nach der HSPC-Transplantation wurde die Frequenz eGFP-exprimierender B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) und Nicht-B-/Nicht-T-Zellen (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

### ***Langzeit-Evaluierung des B-zellspezifischen SIN-Vektors***

Die Transgenexpression eines retroviralen Vektors kann durch die Inaktivierung des Promotors verloren gehen (Abonour et al. 2000; Challita and Kohn 1994; Riviere et al. 1995). Daher wurde untersucht, ob eine eGFP-Expression vom B-zellspezifischen Promotor über Monate hinweg messbar bliebe. Dazu wurde das periphere Blut von SIN-CD19-W Knochenmarkschimären in Woche sechs und 46 nach der Knochenmarkstransplantation mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 14).

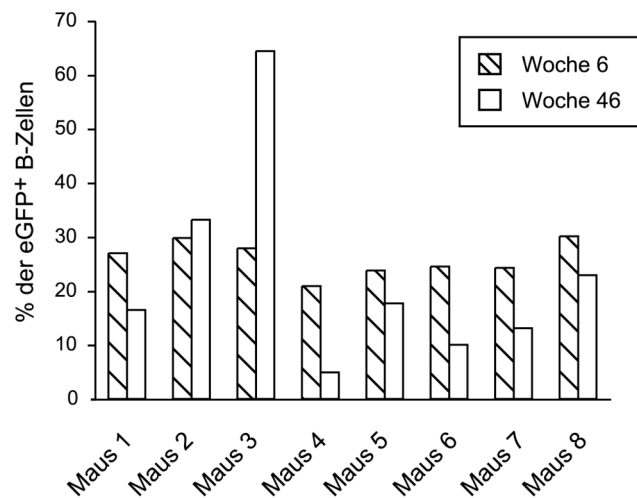


Abb. 14: Langzeit-eGFP-Expression *in vivo*. Die Frequenz eGFP-exprimierender B-Zellen im peripheren Blut wurde sechs und 46 Wochen nach Transplantation SIN-CD19-W-transduzierter HSPC in letal bestrahlte syngene Rezipienten (n=8) durchflusszytometrisch bestimmt.

In Woche sechs konnte in  $26,0 \pm 2,8\%$  der B-Zellen eine eGFP-Expression festgestellt werden. Fast ein Jahr später, in Woche 46, wiesen 75% der Tiere einen reduzierten Anteil transgenexprimierender B-Zellen auf. Es wurde jedoch auch vereinzelt eine unveränderte oder höhere Frequenz (Maus 2 oder 3, Abb. 14) beobachtet. Lediglich eine der acht Mäuse (Maus 4, Abb. 14) wies eine deutliche Reduktion in der Häufigkeit eGFP-positiver B-Zellen auf. Bedeutenderweise wurde in keiner der untersuchten Mäuse ein vollständiger Verlust transgenexprimierender B-Zellen beobachtet. Somit kann eine B-zellspezifische Langzeit-Expression *in vivo* durch Verwendung von SIN-CD19-W erreicht werden.

### 5.3 Hybrid-LTR-Vektoren

Ein alternativer Ansatz zu SIN-Vektoren, in denen die Expression des Transgens unter Kontrolle eines internen Promotors steht, stellen Hybrid-LTR-Vektoren dar. Diese beherbergen im LTR einen heterologen Promotor oder Enhancer, welcher die Transgenexpression kontrolliert. Dazu wird das retrovirale Promotor/Enhancer-Element im LTR durch einen heterologen z.B. zell- oder gewebsspezifischen Promotor ersetzt. So konnte die Stärke und Restriktion der Transgenexpression, sowie die Varianz der Positions-Effekte positiv beeinflusst werden (Lotti et al. 2002). Daher wurde ein das 999-bp-Fragment des



humanen CD19-Promotors in die U3-Region des 3'LTR von pSFβ91 gesetzt (SF-CD19l-W, Abb. 15).

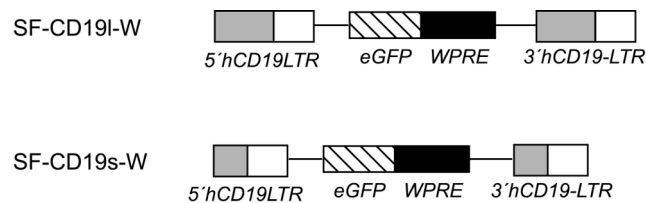


Abb. 15: Schematische Darstellung der Hybrid-LTR-Vektoren mit dem humanen CD19-Promotor. In den Hybrid-LTR-Vektoren befindet sich der humane CD19-Promotor in der U3-Region des LTRs und ersetzt den viralen Promotor/Enhancer. SF-CD19l-W trägt das 999-bp-Fragment und SF-CD19s-W ein 347-bp-Fragment des CD19-Promotors. Die Darstellung bezieht sich auf den Aufbau der Vektoren nach der Integration ins Wirtsgenom.

Es wurde kein SIN-Vektor als Ausgangskonstrukt gewählt, sondern der LTR-Vektor pSFβ91, da dieser einerseits keinen internen Promotor enthält und andererseits eine Leitsequenz mit Spleißdonor und Spleißakzeptor, welche für eine gute Transgenexpression von LTR-getriebenen Vektoren wichtig ist (Hildinger et al. 1999). Um näher an der natürlichen Größe des viralen Promotor/Enhancer-Elements zu bleiben, wurde in einem weiteren Vektorkonstrukt ein nur 347-bp-Fragment verwendet (SF-CD19s-W, Abb. 15). Ein zu großes heterologes Promotor-Element im LTR kann sich negativ auf die Funktionalität des Vektors wie z.B. den viralen Titer auswirken. Andererseits kann eine stark verkürzte Version des humanen CD19-Promotors das B-zellspezifische Expressionsmuster beeinträchtigen. Daher wurden beide Vektoren benutzt, um Knochenmarkschimären zu generieren. Fünf Wochen nach Transplantation der transduzierten HSPC wurde die Frequenz und die MFI eGFP-positiver T-Zellen, B-Zellen und myeloider Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 16).

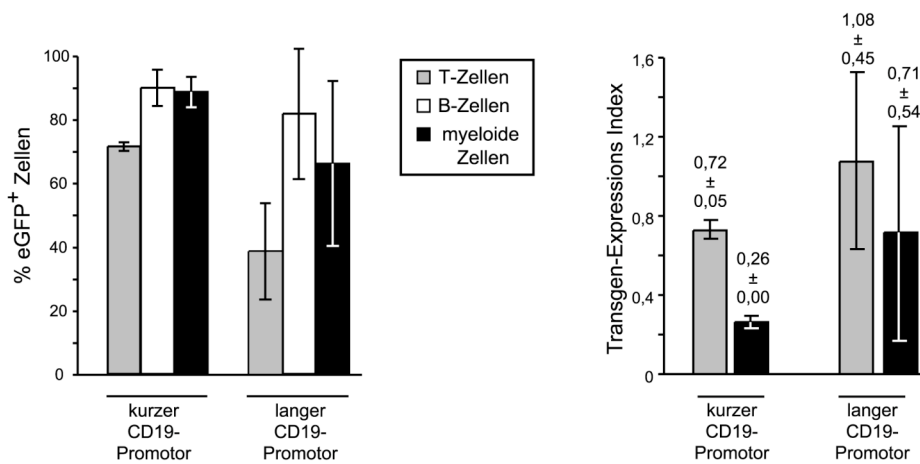


Abb. 16: Expressionsprofil der Hybrid-LTR-Vektoren mit humanem CD19-Promotor *in vivo*. Die HSPC wurden einmal mit dem Hybrid-LTR-Vektor SF-CD19s-W (n=2) oder SF-CD19l-W (n=4) transduziert. Der Vektor SF-CD19s-W trägt ein 347-bp-Fragment des humanen CD19-Promotors, der SF-CD19l-W Vektor das 999-bp-Fragment. Die eGFP-Expression in B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), und myeloiden Zellen (CD11b<sup>+</sup>) wurde fünf Wochen nach Transplantation der HSPC in letal bestrahlte syngene Rezipienten durchflusszytometrisch bestimmt. Der Transgenexpressions-Index (TI) von myeloiden Zellen und T-Zellen wurde relativ zur mittleren eGFP-Fluoreszenzintensität der B-Zellen ermittelt (TI=MFI eGFP<sup>+</sup> T-Zellen oder myeloider Zellen / MFI eGFP<sup>+</sup> B-Zellen).

Die Transgenexpression war für beide Vektoren nicht B-zellspezifisch (Abb. 16a). Wurde der Vektor mit dem langen CD19-Promotorfragment verwendet, exprimierten 60,2 ± 20,4% der B-Zellen, 38,5 ± 15,1% der T-Zellen und 66,1 ± 25,9% der myeloiden Zellen das Transgen. Für den Vektor mit dem 347-bp-Promotor wurde eine höhere Frequenz eGFP-exprimierender Zellen gemessen: 89,9 ± 5,7% B-Zellen, 74,4 ± 1,4% T-Zellen und 88,5 ± 4,8% myeloide Zellen. Anhand der MFI eGFP-positiver T-Zellen und myeloider Zellen wurde relativ zur MFI eGFP-positiver B-Zellen ein Transgenexpressions-Index (TI) bestimmt, der für B-Zellen den Wert 1 beträgt: die MFI der T-Zellen, myeloiden Zellen oder B-Zellen wurde durch die MFI der B-Zellen geteilt. Folglich ist der TI umso kleiner, je schwächer die Transgenexpression in T-Zellen und myeloiden Zellen ist. Ein Vergleich des TI (Abb. 16b) zwischen myeloiden Zellen und T-Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied für den Vektor mit dem langen Promotorfragment auf. Für den Vektor mit dem kurzen Promotorfragment war der TI in myeloiden Zellen signifikant (p=0,01) niedriger als in lymphoiden.

Der virale Titer der Hybrid-LTR-Vektoren schien erhöht zu sein, da eine im Vergleich zum SIN-Vektor fast zweifach erhöhte Frequenz transgener Zellen *in vivo* bei nur einmaliger Transduktion gemessen wurde (vgl. Abb. 16 und Abb. 11d). Folglich könnte die

unspezifische Transgenexpression für die Hybrid-LTR-Vektoren mit der Kopienanzahl integrierter Vektorsequenzen im Genom der transduzierten Zelle assoziiert sein. Daher wurde eine serielle Verdünnungsreihe (1/5, 1/10 und 1/20) von SF-CD19s-W Vektorüberständen zur Transduktion von HSPC eingesetzt (Abb. 17). Dies ermöglichte eine verlässliche Aussage über die Transgenexpression in den einzelnen Zellpopulationen, da bei einer relativ niedrigen Frequenz transgener Zellen davon ausgegangen werden kann, dass nur eine Kopie der Vektorsequenz pro Zelle vorliegt. Es wurde der Vektor SF-CD19s-W ausgewählt, da dieser im Vergleich zu SF-CD19l-W eine schwächere Transgenexpression in Zellen myeloiden Ursprungs gezeigt hatte (Abb. 16).

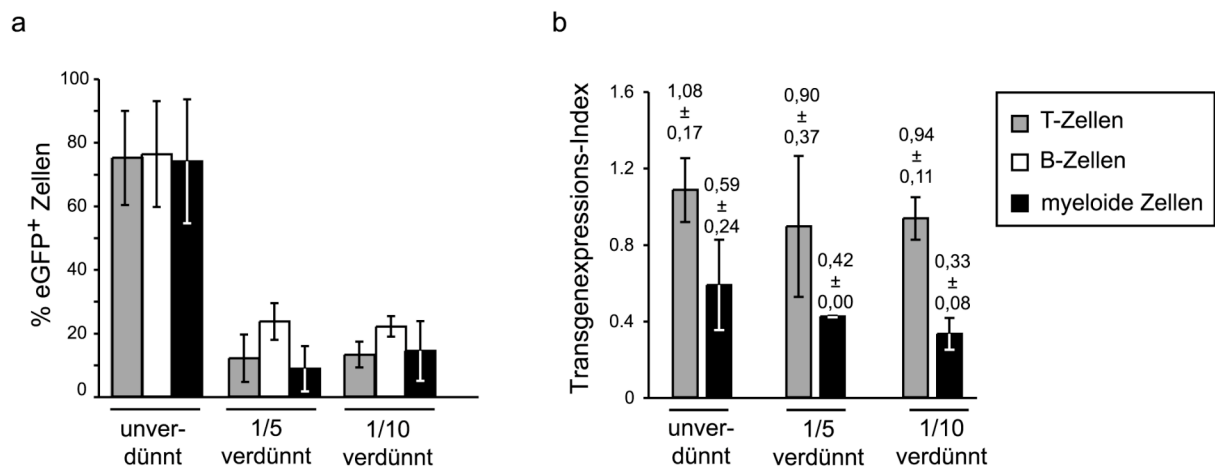


Abb. 17: Expressionsprofil des Hybrid-LTR-Vektors mit kurzem CD19-Promotorfragment unter vektorlimitierten Bedingungen. HSPC wurden einmal mit unverdünnten (n=3) oder seriell verdünnten Vektorüberständen von SF-CD19s-W (kurzes CD19-Promotorfragment, jeweils n=3) transduziert und das periphere Blut 14 Wochen nach Transplantation der HSPC in letal bestrahlte syngene Rezipienten durchflusszytometrisch untersucht. Es ist der Prozentsatz eGFP-exprimierender B-Zellen (CD19<sup>+</sup>), T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), und myeloider Zellen (CD11b<sup>+</sup>) sowie der Transgenexpressions-Index für T-Zellen und myeloide Zellen gezeigt. Der Transgenexpressions-Index von myeloiden Zellen und T-Zellen wurde relativ zur mittleren eGFP-Fluoreszenzintensität der B-Zellen ermittelt.

Wie aus Abb. 17a hervorgeht, war die Transgenexpression auch unter den vektorlimitierten Bedingungen unspezifisch, da  $12,0 \pm 7,5\%$  (1/5 Verdünnung) bzw.  $13,2 \pm 4,1\%$  (1/10 Verdünnung) aller T-Zellen eGFP exprimierten. In der myeloiden Reihe waren  $8,7 \pm 7,2\%$  (1/5 Verdünnung) bzw.  $14,3 \pm 9,4\%$  (1/10 Verdünnung) eGFP-positiv. Somit konnte eine unspezifische Expression aufgrund einer zu hohen Kopienzahl des Vektors in T-Zellen und myeloiden Zellen ausgeschlossen werden. Die Gruppe der 1/20 Verdünnung wies eine zu

geringe Frequenz transgenexprimierender Zellen auf, so dass keine verlässliche Aussage abgeleitet werden konnte. Analog zum vorangegangenen Experiment (Abb. 16) war der TI in myeloiden Zellen für alle Gruppen signifikant ( $p=0,002$ ) niedriger als in T-Zellen (Abb. 17b), d.h. das 347-bp-Fragment des CD19-Promotor scheint eine höhere Aktivität in lymphoiden Zellen als in myeloiden zu besitzen.

Während der humane CD19-Promotor im Kontext eines SIN-Vektors die Transgenexpression auf B-Zellen beschränkte, traf dies in Zusammenhang mit einem Hybrid-LTR-Vektor nicht zu. Somit muss ein reduzierter Virustiter und eine geringere Frequenz transgener B-Zellen akzeptiert werden, um eine B-zellspezifische Transgenexpression *in vivo* zu erreichen.

## 5.4 B-zellspezifische Expression eines Modellantigens *in vivo*

Eine B-zellspezifische Transgenexpression wies nur der Vektor SIN-CD19-W auf. Ferner konnte durch das zweimalige Transduzieren der HSPC mit diesem Vektor eine Frequenz von 30-50% transgenexprimierender B-Zellen *in vivo* erreicht werden. Für alle weiteren Experimente wurde daher ein SIN-Vektor auf Basis von SIN-CD19-W verwendet, mit welchem die HSPC zur Generierung von Knochenmarkschimären zweimal transduziert wurden. Um den Einfluss der Antigenpräsentation durch B-Zellen auf eine antigenspezifische CD8-T-Zellantwort zu untersuchen, wurde das Reportergen eGFP durch das Modellantigen Ovalbumin (OVA) ersetzt (Abb. 18). An Stelle des Reportergens wurde entweder eine lösliche sezernierte Form (sOVA; Rush et al. 2002) des Hühnerei-Albumins oder eine membranständige Form (TfrOVA; Diebold et al. 2001) exprimiert. TfrOVA ist ein Fusionsprotein aus der Transmembrandomäne des humanen Transferrinrezeptors und nativem OVA.

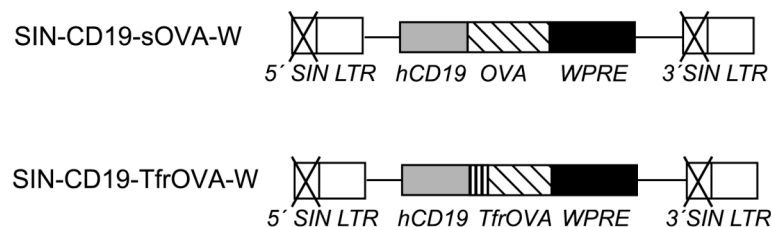


Abb. 18: Schematische Darstellung des B-zellspezifischen SIN-Vektors mit sOVA und TfrOVA. Gezeigt ist der B-zellspezifische SIN-Vektor mit einer cDNA, welche für sezerniertes Ovalbumin (sOVA) oder membranständiges OVA (TfrOVA) kodiert. Die Darstellung bezieht sich auf den Aufbau der Vektoren nach der Integration ins Wirtsgenom.

Es wurde das Hühnerei-Albumin ausgewählt, da für dieses geeignete Tiermodelle und Werkzeuge zur Analyse einer OVA-spezifischen und durch CD8-T-Zellen vermittelten Immunantwort zur Verfügung stehen:

1) Es existiert eine T-Zellrezeptor transgene Maus (OT-1 Maus; Hogquist et al. 1994), in welcher der Hauptanteil (80 - 95%) der CD8-T-Zellen einen klonotypischen Rezeptor trägt, der spezifisch ein oktamer Peptid (SIINFEKL, OVA<sub>257-264</sub>) aus Ovalbumin im Kontext von MHC-I (H-2K<sup>b</sup>) erkennt.

2) Des Weiteren existiert ein Mausmodell (RIP-OVA<sup>lo</sup>-Modell) für eine durch CD8-T-Zellen vermittelte Autoimmunkrankheit, den autoimmunen Diabetes (Blanas and Heath 1999).

3) Mit fluorochrommarkierten MHC-I:Peptid-Tetrameren können polyklonale T-Zellantworten untersucht werden: H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetramere (Busch et al. 1998) z.B. binden an OVA-spezifische T-Zellen, deren TCR das oktamer Peptid SIINFEKL im Kontext von H-2K<sup>b</sup> erkennt.

#### **5.4.1 *In-Vivo*-Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires**

Um zu testen, ob eine Antigenexpression in B-Zellen zu einer OVA-spezifischen Toleranzinduktion in einem polyklonalen CD8-T-Zellrepertoire führt, wurden HSPC aus C57BL/6-Mäusen mit SIN-CD19-sOVA-W, SIN-CD19-TfrOVA-W bzw. virusfreiem Medium transduziert und Knochenmarkschimären (C57BL/6) generiert (Abb. 19). In diesen Chimären wurde dann die Toleranzinduktion in polyklonalen, OVA-spezifischen CD8-T-Zellen gemessen, anhand der Proliferation und Effektorfunktion nach Immunisierung mit einer viralen Vakzine. In nicht immunisierten Mäusen ist die Frequenz SIINFEKL-spezifischer T-Zellen zu gering, um diese mit H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetrameren detektieren zu können. Daher wurden die Chimären bzw. C57BL/6-Mäuse mit  $4 \times 10^6$  pfu einer OVA- bzw. GFP-exprimierenden viralen Herpes-Simplex-Vakzine (Lauterbach et al. 2004) immunisiert (Abb. 19).

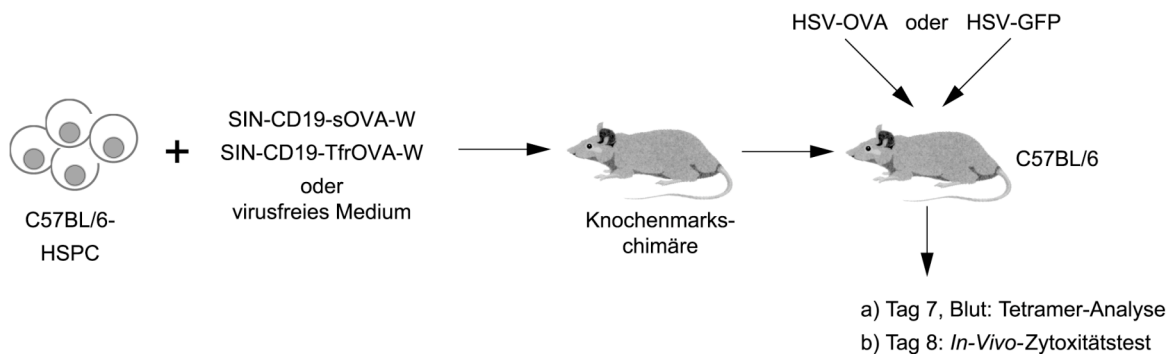


Abb. 19: Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus. HSPC aus C57BL/6-Mäusen wurden mit SIN-CD19-sOVA-W, SIN-CD19-TfrOVA-W oder virusfreiem Medium transduziert und Knochenmarkschimären generiert (je  $n=4$ ). Sechs Wochen nach Transplantation der transduzierten HSPC wurde mit  $4 \times 10^6$  pfu einer viralen Vakzine (HSV-OVA oder als Kontrolle HSV-GFP) immunisiert. Sieben Tage nach der Immunisierung wurde die Frequenz OVA-spezifischer CD8-T-Zellen im peripheren Blut mit H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetrameren durchflusszytometrisch bestimmt. Desweiteren wurde an Tag acht nach der Immunisierung ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Im Vergleich zu HSV-GFP-immunisierten C57BL/6-Mäusen (Negativ-Kontrolle), wurde eine signifikante Expansion SIINFEKL-spezifischer CD8-T-Zellen an Tag sieben (Abb. 20a) nach Immunisierung nur in chimären Mäusen gefunden, welche kein OVA in B-Zellen exprimierten. Chimären, welche sOVA oder TfrOVA in B-Zellen exprimierten, zeigten im Vergleich zu HSV-GFP-immunisierten Mäusen keine erhöhte Frequenz Tetramer-positiver (H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL) CD8-T-Zellen. In diesem System ist die Varianz bzgl. der Frequenz Tetramer-positiver CD8-T-Zellen hoch, da die Mäuse, obwohl sie syngene sind, ein unterschiedliches T-Zellrepertoire besitzen. Um auszuschließen, dass eine sehr kleine, aber nicht mit H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetrameren zu messende SIINFEKL-spezifische T-Zellpopulation in den Knochenmarkschimären existierte, wurde an Tag acht ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest (Abb. 20b) durchgeführt. Dieser sensitive Test basiert auf der selektiven *In-Vivo*-Eliminierung von peptidbeladenen und CFSE-markierten Milzzellen. In den OVA-exprimierenden Chimären wurde weder eine spezifische Eliminierung SIINFEKL-beladener Zielzellen beobachtet (Abb. 20b), noch IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen gefunden (Abb. 20c). Hingegen wiesen die Tetramer-positiven CD8-T-Zellen in der Positiv-Kontrolle eine Effektorfunktion auf, da der Großteil dieser Zellen IFN- $\gamma$  produzierte und die peptidbeladenen Milzzellen effizient eliminierte.

Dies bedeutet, dass ein polyklonales T-Zellrepertoire antigenspezifisch toleriert werden kann, indem das Antigen selektiv in B-Zellen exprimiert wird. Dabei manifestiert sich die

Toleranz auf Ebene der T-Zellexpansion und der IFN- $\gamma$ -Produktion nach einer Immunisierung.

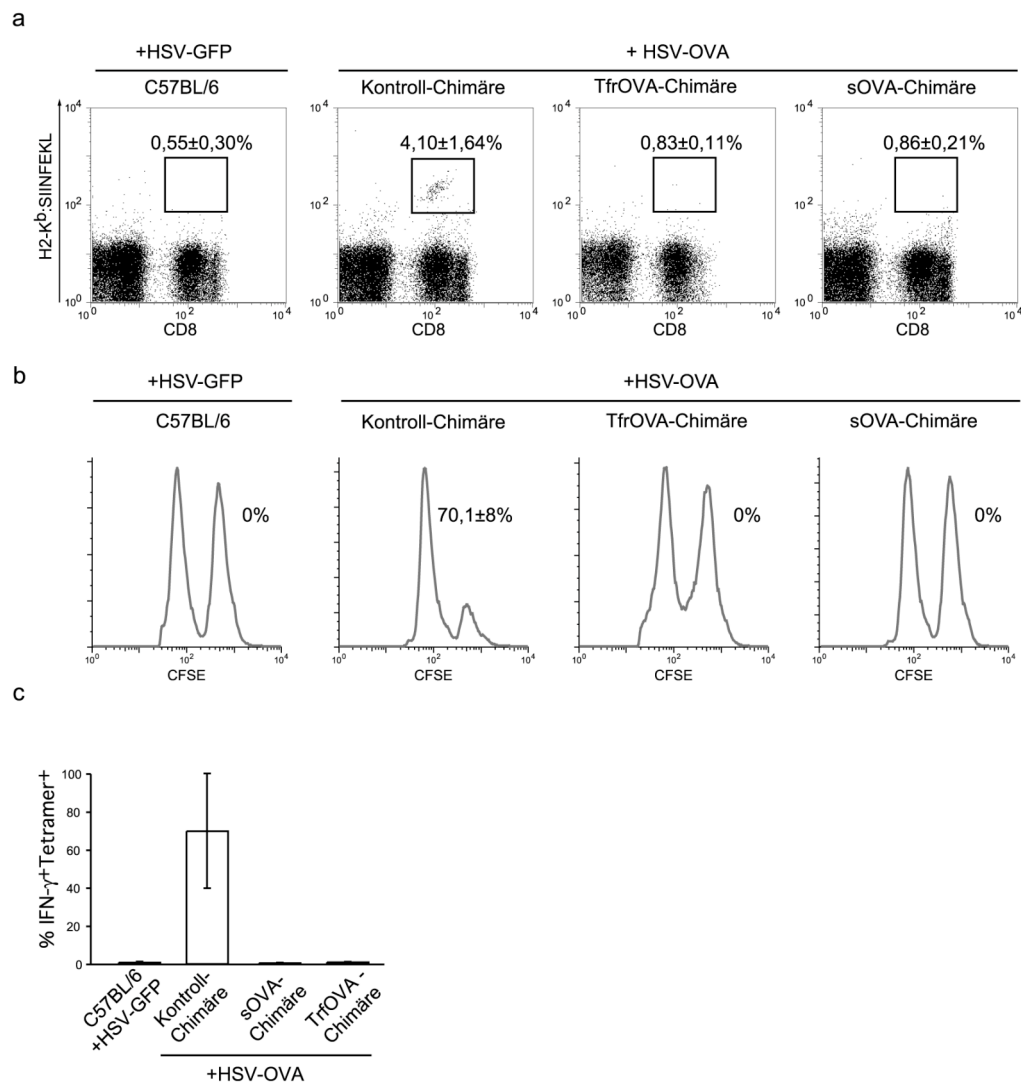


Abb. 20: *In-Vivo*-Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires. Es wurden HSPC aus C57BL/6-Mäusen mit SIN-CD19-sOVA-W, SIN-CD19-TfrOVA-W bzw. virusfreiem Medium transduziert und Knochenmarkschimären generiert. Die Chimären bzw. C57BL/6-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA bzw. HSV-GFP immunisiert ( $n=4$ ). a) Die Frequenz polyklonaler, OVA-spezifischer CD8-T-Zellen wurde mit H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetrameren und einem monoklonalen anti-CD8-Antikörper an Tag sieben nach der Immunisierung im peripheren Blut durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil der Tetramer-positiven CD8-Zellen von allen CD8-Zellen ist im jeweiligen Diagramm angegeben. An Tag acht wurde ein auf CFSE basierender *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt und die spezifische Lyse von SIINFEKL-beladenen, CFSE-markierten Zielzellen nach 15 Stunden durchflusszytometrisch anhand der Analyse von Milzzellen bestimmt. Die Ergebnisse in a) und b) sind repräsentativ für mindestens zwei Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden. c) Die Milzzellen wurden für fünf Stunden *in vitro* mit SIINFEKL restimuliert und die Frequenz IFN- $\gamma$ -produzierender und Tetramer-positiver (H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL) CD8-T-Zellen ermittelt.

## 5.4.2 *In-Vitro*- und *In-Vivo*-Analyse der operierenden

### Toleranzmechanismen

Im polyklonalen System konnte gezeigt werden, dass eine Antigenexpression in B-Zellen zur Tolerisierung eines CD8-T-Zellrepertoires führt. Ob es sich dabei um zentrale oder periphere Toleranz handelt und welche Mechanismen der Toleranzinduktion (Deletion oder z.B. Anergisierung) zugrunde liegen, lässt sich aufgrund der geringen Frequenz OVA-spezifischer T-Zellen in diesem System nicht untersuchen. Daher wurden HSPC aus dem TCR-transgenen OT-1-Mausstamm verwendet, mit SIN-CD19-sOVA-W, SIN-CD19-TfrOVA-W oder virusfreiem Medium transduziert und in letal bestrahlte C57BL/6-Mäuse transferiert. Nach Rekonstitution des hämatopoetischen Systems besitzen diese Knochenmarkschimären ebenfalls ein TCR-transgenes CD8-T-Zellrepertoire, welches dem des OT-1 Stamms entspricht (Abb. 21).

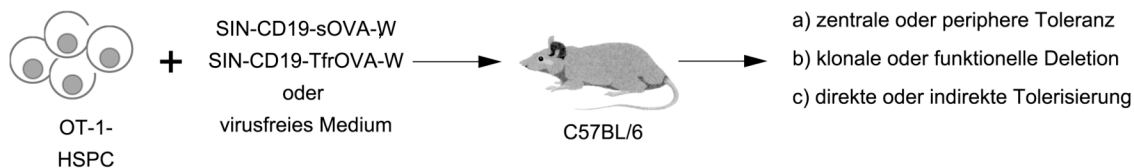


Abb. 21: Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus. HSPC aus OT-1-Mäusen wurden mit SIN-CD19-sOVA-W, SIN-CD19-TfrOVA-W oder virusfreiem Medium transduziert und Knochenmarkschimären generiert (n=2-4). Frühestens fünf Wochen nach der Transplantation der transduzierten HSPC wurden Thymus und Milz entnommen, um den genauen Mechanismus der Toleranzinduktion zu untersuchen.

In diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob die CD8-T-Zellen zentral oder peripher tolerisiert werden. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob der T-Zelltoleranz erstens eine klonale oder funktionelle Deletion und zweitens eine direkte oder indirekte Tolerisierung zugrunde liegt.

#### 5.4.2.1 Zentrale oder periphere Toleranz

Ein zentraler Toleranzmechanismus würde sich in einer reduzierten Anzahl und Frequenz an OT-1-Thymozyten widerspiegeln. Ein Vergleich zwischen Kontroll-Chimären und sOVA-Chimären ergab eine vergleichbare Frequenz (Abb. 22a) und Anzahl (Abb. 22b) an CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> OT-1-T-Zellen im Thymus. Ein ähnliches Bild ergab die Analyse von TfrOVA-



exprimierenden Chimären (Abb. 22b). Die Daten sind repräsentativ für mindestens zwei Experimente, welche mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

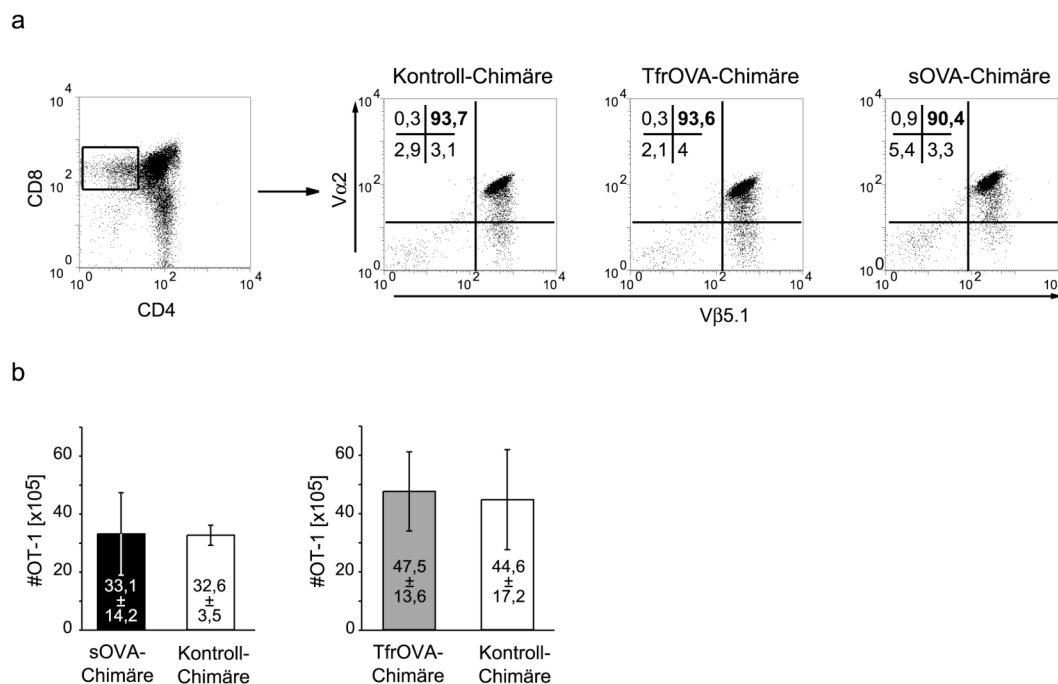


Abb. 22: Bestimmung der Frequenz und Zellzahl CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TCR-transgener OT-1-Thymozyten. HSPC aus OT-1-Mäusen wurden mit SIN-CD19-sOVA-W (n=4), SIN-CD19-TfrOVA-W (n=3) bzw. virusfreiem Medium transduziert (n=2-3) und Knochenmarkschimären generiert. Der Thymus wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8, Vα2 und Vβ5.1 durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden nur die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> einfach positiven Thymozyten betrachtet. Ausgehend von dieser Population wurde a) die Frequenz und b) die absolute Zellzahl TCR-transgener OT-1-Thymozyten (Vα2<sup>+</sup>Vβ5.1<sup>+</sup>) durchflusszytometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig durchgeführte Experimente.

Dies zeigt, dass der Tolerisierung des OVA-spezifischen CD8-T-Zellrepertoires kein zentraler Toleranzmechanismus mit klonaler Deletion zu Grunde liegt. Hingegen war in der Milz die Frequenz der OT-1-T-Zellen (Vα2<sup>+</sup>Vβ5.1<sup>+</sup>) von sOVA- und TfrOVA-Chimären gegenüber Kontroll-Chimären signifikant erniedrigt (Abb. 23a). Im Gegenzug war die Frequenz der T-Zellen erhöht, welche nicht den klonotypischen OT-1-T-Zellrezeptor trugen und Vα2<sup>+</sup>Vβ5.1<sup>-</sup>, Vα2<sup>-</sup>Vβ5.1<sup>+</sup> oder Vα2<sup>-</sup>Vβ5.1<sup>-</sup> waren. Ferner wurde in allen Experimenten in der Milz von sOVA- bzw. TfrOVA-Chimären 44,6 ± 8,9% bzw. 53,6 ± 12,9% weniger CD8-T-Zellen (Daten nicht gezeigt) und 55,8 ± 9,2% bzw. 78,1 ± 9,2% weniger OT-1-T-Zellen gefunden als in Kontroll-Chimären (Abb. 23b). Die Daten sind repräsentativ für vier (sOVA) bzw. zwei (TfrOVA) Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

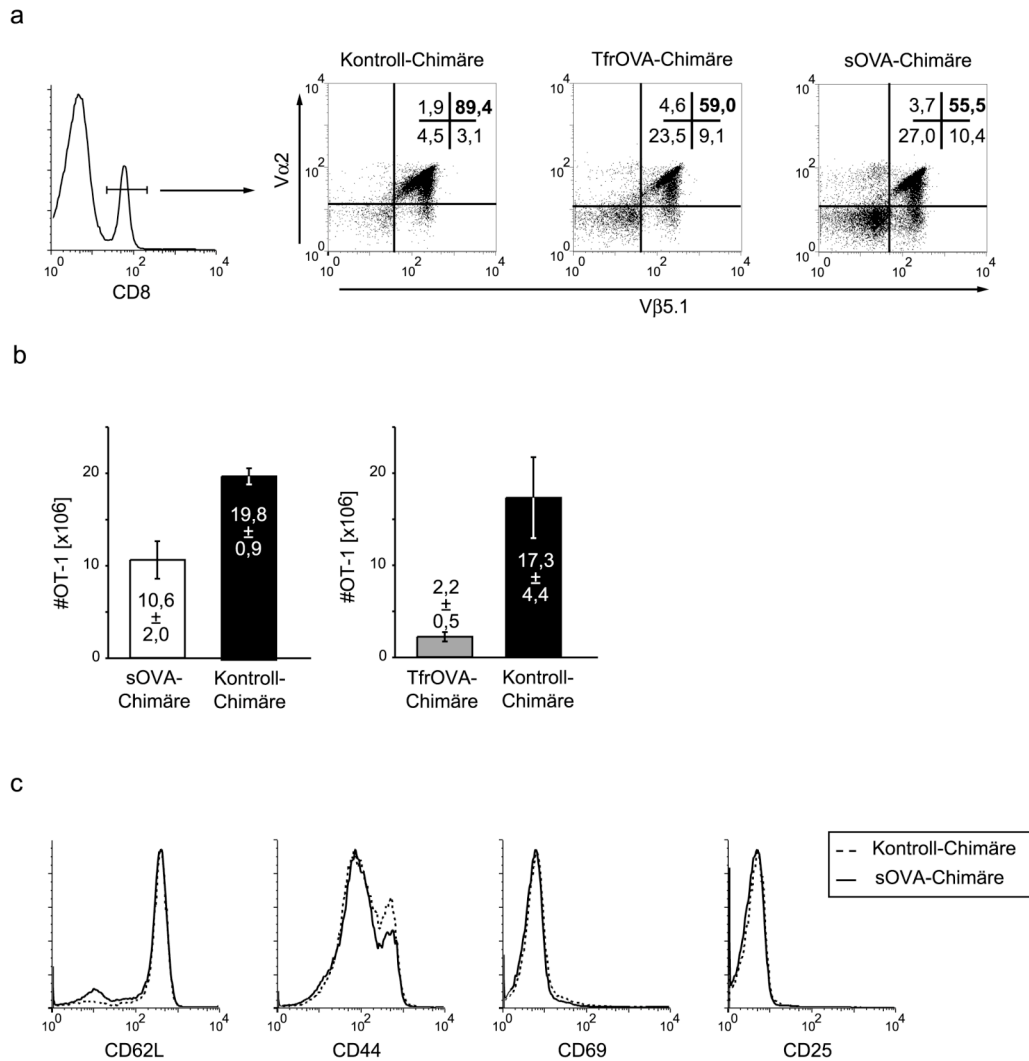


Abb. 23: Analyse der Frequenz, Zellzahl und des Aktivierungsstatus CD8<sup>+</sup> TCR-transgener OT-1-T-Zellen. HSPC aus OT-1-Mäusen wurden mit SIN-CD19-sOVA-W (n=4), SIN-CD19-TfrOVA-W (n=3) bzw. virusfreiem Medium (n=2-3) transduziert und Knochenmarkschimären generiert. Die Milzzellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8, Vα2, Vβ5.1 und die Aktivierungsmarker CD62L, CD44, CD69 oder CD25 durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden nur CD8-Zellen betrachtet. Ausgehend von dieser Population, wurde die Frequenz und absolute Zellzahl von OT-1-T-Zellen ermittelt. a) Gezeigt ist die Frequenz von CD8-T-Zellen, welche Vα2 und Vβ5.1 (OT-1-T-Zellen) exprimieren, nur Vα2 oder nur Vβ5.1 bzw. weder Vα2 noch Vβ5.1. b) Die absolute Zellzahl CD8-positiver TCR-transgener OT-1-T-Zellen ist angegeben. Ferner wurden die OT-1-T-Zellen aus sOVA- und Kontroll-Chimären auf die Expression der Aktivierungsmarker CD62L, CD44, CD69 oder CD25 untersucht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier (sOVA) bzw. zwei (TfrOVA) Experimente, die mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt wurden.

Die in sOVA-Chimären verbliebenen OT-1-T-Zellen wurden auf die Expression von CD62L, CD44, CD69, CD25 durchflusszytometrisch untersucht. Es handelt sich dabei um Marker, die als Folge eines Kontakts der T-Zelle mit ihrem spezifischen Antigen hoch oder nieder reguliert werden. Im Vergleich zu OT-1-T-Zellen aus Kontroll-Chimären wurde jedoch keine

unterschiedliche Expression bzw. Regulation dieser Marker gefunden (Abb. 23c). Diese Daten zeigen, dass die Antigenexpression in B-Zellen zur Tolerisierung von CD8-T-Zellen in der Peripherie führt und dass einer der daran beteiligten Mechanismen die Deletion autoreaktiver T-Zellen ist.

#### **5.4.2.2 Klonale oder funktionelle Deletion**

Um zu überprüfen, ob neben der klonalen auch eine funktionelle Deletion (Anergisierung) der autoreaktiven T-Zellen eine Rolle spielt, wurden die OT-1-T-Zellen aus sOVA- oder Kontroll-Chimären isoliert, mit CFSE markiert und mit syngenem, peptidbeladenen Milzzellen *in vitro* stimuliert. Zum Beladen der Milzzellen wurde eine geringe Peptidmenge (100 pMol SIINFEKL) gewählt, um funktionelle Unterschiede nicht durch einen Antigenüberschuss zu maskieren. Eine funktionelle Beeinträchtigung der OT-1-T-Zellen könnte sich im Prozentsatz der proliferierenden T-Zellen, der Anzahl der Zellteilungen als Funktion der CFSE-Verdünnung und der Expression diverser Aktivierungsmarker widerspiegeln. Die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L, CD69 und CD25, sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität war in beiden Gruppen ähnlich (Abb. 24a). CD44 wurde in beiden Gruppen gleichermaßen hoch reguliert. In aktivierten T-Zellen wird CD62L herunter reguliert, damit diese zu infizierten Geweben und Organen auswandern zu können. Dies erfolgte in beiden Gruppen ab der zweiten Teilung. Die Expression von CD25 und CD69, welche nur für kurze Zeit nach der initialen Aktivierung exprimiert sind, nahm mit fortschreitender Teilung ab. Für CD5, welches die Signalleitung vom T-Zellrezeptor negativ reguliert, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Ferner ließ sich zwischen beiden Gruppen kein Unterschied in der Frequenz der sich teilenden Zellen und der Anzahl der Zellteilungen erkennen (Abb. 24b).

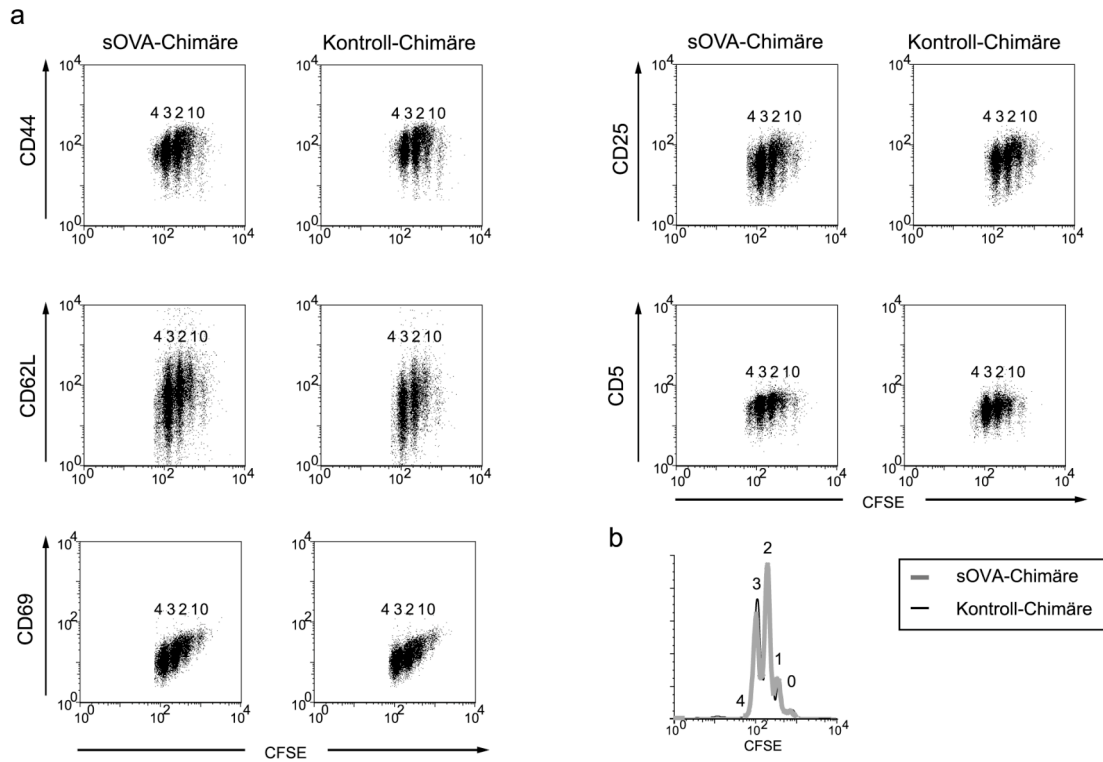


Abb. 24: *In-Vitro*-Proliferationstest mit OT-1-T-Zellen aus sOVA-Chimären. OT-1-T-Zellen wurden aus sOVA- oder Kontroll-Chimären isoliert, mit CFSE markiert und *in vitro* mit 100 pMol SIINFEKL restimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Proben a) auf die Expression von CD44, CD62L, CD69, CD25 und CD5 sowie die Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch untersucht. b) Exemplarische Darstellung der CFSE-Verdünnung von stimulierten OT-1-T-Zellen aus sOVA- oder Kontroll-Chimären. Die Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit OT-1-T-Zellen aus unabhängigen Knochenmarkschimären.

Die Funktionalität der in den sOVA- bzw. TfrOVA-Chimären verbliebenen OT-1-T-Zellen wurde zusätzlich *in vivo* überprüft (Abb. 25). Dazu wurden diese in RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse transferiert, welche Ovalbumin spezifisch im Pankreas exprimieren. Anhand der Induktion von Diabetes nach Immunisierung mit Ovalbumin kann auf eine Aktivierung und Differenzierung der transferierten T-Zellen zu Effektorzellen geschlossen werden. Es wurden Milzzellen mit einem Anteil von  $0,75 \times 10^6$  (TfrOva-Chimäre) oder  $1 \times 10^6$  (sOVA-Chimäre) OT-1-T-Zellen aus OVA-exprimierenden Tieren oder Kontroll-Tieren in RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse transferiert. Um OVA-exprimierende B-Zellen zu entfernen, wurden CD19-positive Zellen von der Milzsuspension depletiert. Die Mäuse wurden einen Tag nach Transfer der T-Zellen mit einer OVA-kodierenden DNA-Vakzine (CMV- $\beta$ g-OVA, Lauterbach et al. 2004) immunisiert.

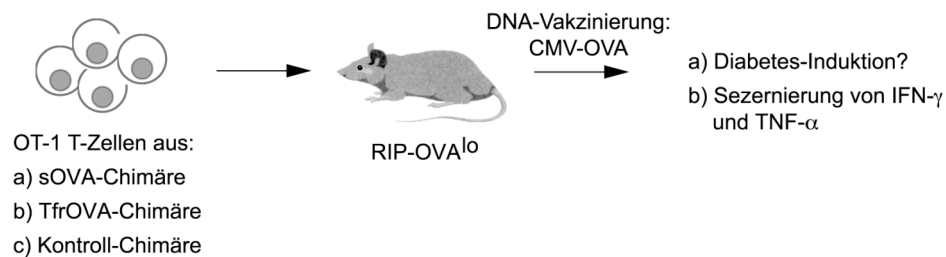


Abb. 25: Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus. OT-1-T-Zellen aus sOVA-, TfrOVA- oder Kontroll-Chimären wurden in RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse transferiert. Anschließend erfolgte eine Immunisierung mit einer DNA-Vakzine, welche für OVA kodiert. Die Aktivierung der T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen wurde anhand der Diabetes-Induktion und der Sezernierung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bestimmt.

In diesem Modell genügen bereits  $1 \times 10^5$  oder weniger OT-1-T-Zellen, um eine Diabeteserkrankung nach einer OVA-Immunisierung auszulösen (P. Kleindienst, unveröffentlichte Beobachtungen). Die Schwere der Diabeteserkrankung kann anhand der Glukosekonzentration im Urin mit einem Glukose-Teststreifen ermittelt werden. Für die OT-1-T-Zellen aus sOVA- (Abb. 26a) oder TfrOVA-Chimären (Abb. 26b) wurden jeweils zwei bis drei Experimente mit unabhängigen Knochenmarkschimären durchgeführt.

Acht Tage nach der Immunisierung erkrankte die Gruppe an Diabetes, welche OT-1-T-Zellen aus Kontroll-Chimären erhalten hatten (Abb. 26a). Hingegen zeigten jene Tiere, welche OT-1-T-Zellen aus sOVA-Chimären erhalten hatten, zu keinem der getesteten Zeitpunkte Anzeichen einer Diabeteserkrankung. Das Experiment wurde zweimal wiederholt (Daten nicht gezeigt, n=4-6). Um einen Einfluss von potentiell regulatorischen CD4-T-Zellen auszuschließen, erhielt in diesen Experimenten eine zusätzliche Gruppe chimäre Milzzellen, welche nicht nur von CD19-positiven Zellen sondern auch von CD4-T-Zellen depletiert worden waren. Obwohl im Gegensatz zum ersten Experiment auch jene Gruppen diabetisch wurden, welche CD19-depletierte und CD19-/CD4-depletierte OT-1-T-Zellen aus sOVA-Chimären erhalten hatten, zeigte die deutlich erniedrigte Diabeteshäufigkeit, dass diese T-Zellen funktionell beeinträchtigt waren (Daten nicht gezeigt). Eine Diabeteserkrankung wurde in maximal 83% der Tiere beobachtet. Des weiteren fiel die Erkrankung schwächer aus, da die durchschnittliche Glukosekonzentration signifikant niedriger ( $p=0,00028$ , Student'scher *t*-Test) als in der Kontroll-Gruppe war. Die zusätzliche Depletion von CD4-T-Zellen übte keinen Einfluss auf die Häufigkeit oder die Schwere der Diabeteserkrankung aus (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Ergebnisse wurden für OT-1-T-Zellen aus TfrOVA-Chimären erhalten (Abb. 26b), wobei zwei Experimente mit unabhängigen

Knochenmarkschimären durchgeführt (n=6-9) wurden. In deren Verlauf waren die Tiere, welche OT-1-T-Zellen aus TfrOVA-Chimären erhalten hatten, entweder vollständig vor einer Diabetesinduktion geschützt (Abb. 26b), oder aber die Inzidenz sowie der Krankheitsverlauf, gemessen an der durchschnittlichen Glukosekonzentration, fiel signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe aus (p=0,014, Mann-Whitney Test, Daten nicht gezeigt). Auch hier übte die Depletion von CD4-T-Zellen keinen Einfluss auf die Häufigkeit oder die Schwere der Diabeteserkrankung aus (Daten nicht gezeigt).

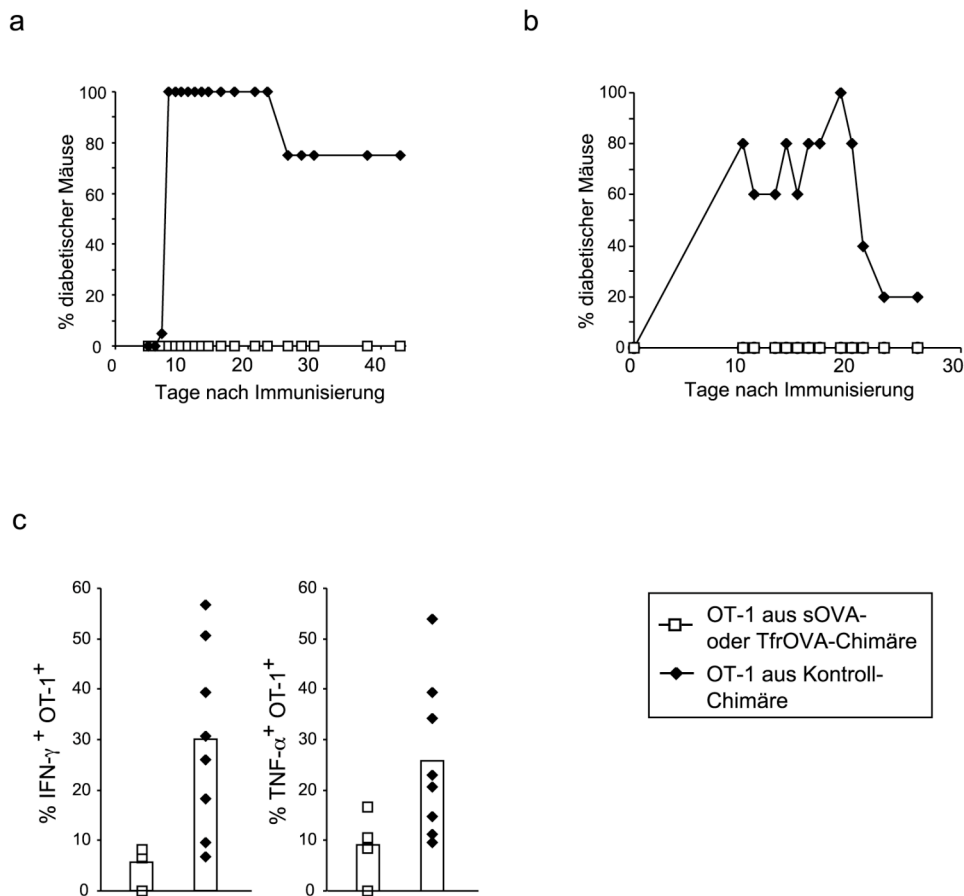


Abb. 26: Charakterisierung der OT-1-T-Zellen aus sOVA- oder TfrOVA-Chimären im RIP-OVA<sup>lo</sup>-Modell. CD19-depletierte Milzzellen aus a) sOVA-Chimären oder b) TfrOVA-Chimären mit einem Anteil von  $1 \times 10^6$  (sOVA) oder  $0,75 \times 10^6$  (TfrOVA) OT-1-T-Zellen wurden in RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse (je n=4-6) transferiert. Einen Tag später erfolgte die DNA-Immunisierung mit CMV- $\beta$ g-OVA. Die Diabetesinduktion wurde anhand der Glukosekonzentration im Urin mit Teststreifen (Skala 5,6 – 278 nmol/l Glukose) ermittelt. Mäuse mit einer Glukosekonzentration  $\geq 5,6$  nmol/l wurden als diabetisch betrachtet. a), b) Der Prozentsatz diabetischer Mäuse ist gezeigt. c) An Tag 43 wurde die Milz der Tiere aus a) entnommen, *in vitro* mit SIINFEKL restimuliert und die Frequenz IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -produzierender OT-1-T-Zellen mit einer intrazellulären Zytokinmessung bestimmt. □ und ◆ stellen einzelne Tiere einer Gruppe dar, die Balken geben den jeweiligen Durchschnittswert der Gruppe an.

Um eine funktionelle Inaktivierung der OT-1-T-Zellen auch auf Ebene der IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Sekretion festzumachen, wurden die Tiere, welche OT-1-T-Zellen aus sOVA- bzw. Kontroll-Chimären erhalten hatten an Tag 43 getötet. Die *In-Vitro*-Restimulation der Milzzellen zeigte, dass im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine signifikant niedrigere Frequenz von OT-1-T-Zellen IFN- $\gamma$  ( $5,4 \pm 3,2\%$  gegenüber Kontrolle:  $29,7 \pm 15,1\%$ ;  $p = 0,007$ ; Abb. 26c) und TNF- $\alpha$  ( $8,9 \pm 5,9\%$  gegenüber Kontrolle:  $25,8 \pm 11,7\%$ ;  $p = 0,025$ ; Abb. 26c) produzierte. Die Gesamtanzahl der OT-1-T-Zellen in der Milz war jedoch in beiden Gruppen mit  $6,4 \pm 0,6 \times 10^4$  (sOVA) und  $8,7 \pm 3,3 \times 10^4$  (Kontrolle) ähnlich. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die Experimente mit OT-1-T-Zellen aus TfrOva-Chimären erhalten (Daten nicht gezeigt).

Obwohl die einzelnen Experimente im RIP-OVAlo-Modell für die OT-1-T-Zellen aus sOVA- oder TfrOVA-Chimären nicht zu völlig identischen Ergebnissen führten, lassen sie eine Aussage über die funktionelle Beeinträchtigung dieser Zellen zu. Sie zeigen, dass im OT-1-TCR-transgenen Modell nicht nur die periphere klonale Deletion, sondern auch die funktionelle Deletion zur Tolerisierung OVA-spezifischer CD8-T-Zellen beiträgt. Ferner lassen die Daten der *In-Vitro*-Stimulation vermuten, dass die OT-1-T-Zellen aus den OVA-exprimierenden Chimären eine zu Kontroll-Zellen vergleichbare proliferative Kapazität und Regulation der Aktivierungsmarker besitzen.

### 5.4.2.3 Direkte oder indirekte Tolerisierung

Der beobachteten Tolerisierung des polyklonalen und TCR-transgenen CD8-T-Zellrepertoires kann eine direkte Antigenpräsentation durch B-Zellen zugrunde liegen. Alternativ kann die Tolerisierung auch auf die Kreuzpräsentation des Antigens durch Dendritische Zellen zurückzuführen sein. Unter Kreuzpräsentation versteht man die Aufnahme von exogenem Antigen und dessen Präsentation im Kontext von MHC-I (Belz, Carbone et al. 2002; den Haan et al. 2000). Obwohl *in vitro* die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation einigen antigenpräsentierenden Zellen zugeschrieben wurde, konnte dies *in vivo* bisher nur für Dendritische Zellen und im speziellen für CD8-positive Dendritische Zellen beobachtet werden (Ackerman and Cresswell 2004).

Zuerst sollte untersucht werden, ob die beobachtete periphere Tolerisierung auf eine unspezifische Expression des Antigens in Dendritischen Zellen zurückzuführen sein könnte. Der Nachweis einer für OVA-kodierenden mRNA in Dendritischen Zellen wurde aus mehreren Gründen nicht geführt: zum einen besagt der Nachweis einer mRNA nicht, dass

auch das entsprechende Protein existiert. Selbst wenn das Protein in der Zelle vorliegt, ist unklar, ob eine genügend hohe Dichte an MHC:Peptid-Komplexen vorliegt, um eine funktionelle Auswirkung auf T-Zellen zu haben. Daher wurde versucht, den Nachweis auf Ebene der Interaktion einer Dendritischen Zelle mit einer T-Zelle zu führen. Dazu wurden Knochenmarkszellen aus sOVA- oder Kontroll-Chimären in Gegenwart von GM-CSF für neun Tage kultiviert und zu reifen Dendritischen Zellen differenziert. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die sich in der Kultur entwickelnden Dendritischen Zellen das von Knochenmarks-B-Zellen hergestellte Antigen aufnehmen, da die B-Zellen während der ersten Tage unter diesen Kulturbedingungen sterben. Die Dendritischen Zellen aus sOVA-Chimären sollten dann als DC-Vakzine im Hinblick auf ihre stimulatorischen Eigenschaften für OT-1-T-Zellen getestet werden. Würden die Dendritischen Zellen aus sOVA-Chimären Ovalbumin unspezifisch exprimieren und eine genügend hohe Dichte an MHC-I:SIINFEKL-Komplexen generieren, so sollten sie OT-1-T-Zellen *in vivo* aktivieren und zur Proliferation anregen können. Daher wurden C57BL/6-Mäuse, welche Milzzellen mit einem Anteil von  $2,4 \times 10^6$  OT-1-T-Zellen drei Tage zuvor erhalten hatten, mit  $3 \times 10^6$  Dendritischen Zellen aus der Knochenmarkskultur der Chimären injiziert. Um sicherzugehen, dass die aus den Chimären gewonnenen Dendritischen Zellen funktionell nicht beeinträchtigt sind, sondern prinzipiell T-Zellen *in vivo* stimulieren können, wurde eine Gruppe mit SIINFEKL-beladenen Dendritischen Zellen injiziert. Nach vier Tagen wurde die Frequenz der OT-1-T-Zellen im peripheren Blut durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 27). Ein Vergleich der OT-1-T-Zellfrequenz am Tag vor und vier Tage nach der DC-Injektion zeigte, dass weder Dendritische Zellen aus den Kontroll-Chimären noch aus den sOVA-Chimären die TCR-transgenen T-Zellen stimulieren konnten. Die T-Zellen expandierten nur, wenn SIINFEKL-beladene Dendritische Zellen verwendet wurden. Dieses Experiment zeigt, dass in Dendritischen Zellen kein oder nicht genügend OVA exprimiert wird, um eine funktionelle Auswirkung auf T-Zellen zu haben.



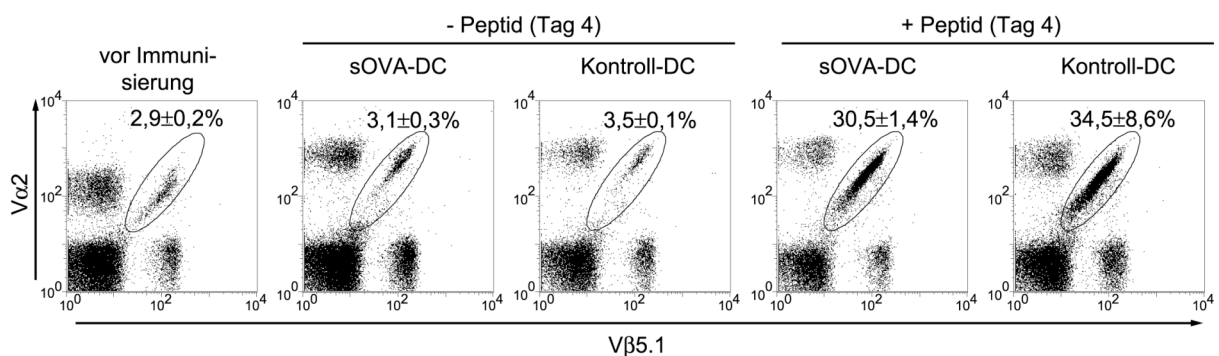


Abb. 27: Immunisierung mit Dendritischen Zellen aus sOVA-Chimären. Knochenmarkszellen aus sOVA- und Kontroll-Chimären wurden in Gegenwart von GM-CSF zu reifen Dendritischen Zellen differenziert. In C57BL/6-Mäuse wurden Milzzellen mit einem Anteil von  $2,4 \times 10^6$  OT-1-T-Zellen und drei Tage später  $3 \times 10^6$  Dendritische Zellen injiziert. Als Positiv-Kontrolle wurden Dendritische Zellen verwendet, die zusätzlich mit SIINFEKL beladen worden waren. Nach vier Tagen wurde die Frequenz der OT-1-T-Zellen im peripheren Blut anhand ihrer Expression von CD8, Va2 und Vb5.1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Frequenz der OT-1-T-Zellen (Va2<sup>+</sup>Vb5.1<sup>+</sup>) innerhalb der CD8-T-Zellpopulation ist angegeben.

Als nächstes wurde untersucht, ob das von B-Zellen hergestellte lösliche Ovalbumin von Dendritischen Zellen aufgenommen und kreuzpräsentiert wird. Dazu wurden CD11c-positive Dendritische Zellen und CD19-positive B-Zellen aus der Milz von Kontroll- und sOVA-Chimären isoliert. Es wurden  $4 \times 10^5$  Dendritische Zellen oder B-Zellen zur *In-Vitro*-Stimulierung von  $1 \times 10^6$  CFSE-markierten OT-1-T-Zellen verwendet. Um aus B-Zellen effiziente antigenpräsentierende Zellen zu erhalten, wurde in einem Ansatz die B-Zellen durch die Zugabe eines monoklonalen anti-CD40 Antikörpers über CD40 stimuliert. Als Positiv-Kontrolle für die Kreuzpräsentation von exogenem OVA wurden Dendritische Zellen und B-Zellen aus einer C57BL/6-Maus verwendet, welche zwölf Stunden zuvor mit  $100 \mu\text{g}$  OVA i.v. injiziert worden war. Nach zwei Tagen wurde die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen anhand der CFSE-Verdünnung durchflusszytometrisch untersucht. Im Gegensatz zu Dendritischen Zellen aus Kontroll-Chimären, konnten nur Dendritische Zellen aus der Positiv-Kontrolle bzw. den sOVA-Chimären OT-1-T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen (Abb. 28). Dies wurde an der CFSE-Verdünnung und Hochregulation der CD44-Expression deutlich. Ferner konnten auch die B-Zellen aus der Positiv-Kontrolle und den sOVA-Chimären OT-1-T-Zellen stimulieren, jedoch wesentlich ineffizienter als Dendritische Zellen. Dies ist am Prozentsatz der T-Zellen, welche sich mehr als einmal geteilt haben, zu erkennen. Auch weisen die T-Zellen, welche mit B-Zellen stimulierten worden waren, in der ersten Teilung eine niedrigere CD44 Expression auf. Der höhere Prozentsatz proliferierender OT-1-T-Zellen, welche mit B-Zellen aus sOVA-Chimären stimuliert worden waren, zeigt im

Vergleich zur Stimulation mit B-Zellen aus der Positiv-Kontrolle den Unterschied zwischen exogenem und endogenem Antigen auf. Wie erwartet konnte eine stärkere T-Zellproliferation durch den Zusatz eines anti-CD40 Antikörpers zur B-Zellkultur erreicht werden. In B-Zellen scheint die effiziente Kreuzpräsentation von einem Aktivierungssignal wie CD40-Signal abzuhängen. Dies geht aus dem Vergleich der T-Zellproliferation für die Stimulation von CD40-stimulierten und unstimulierten B-Zellen hervor.

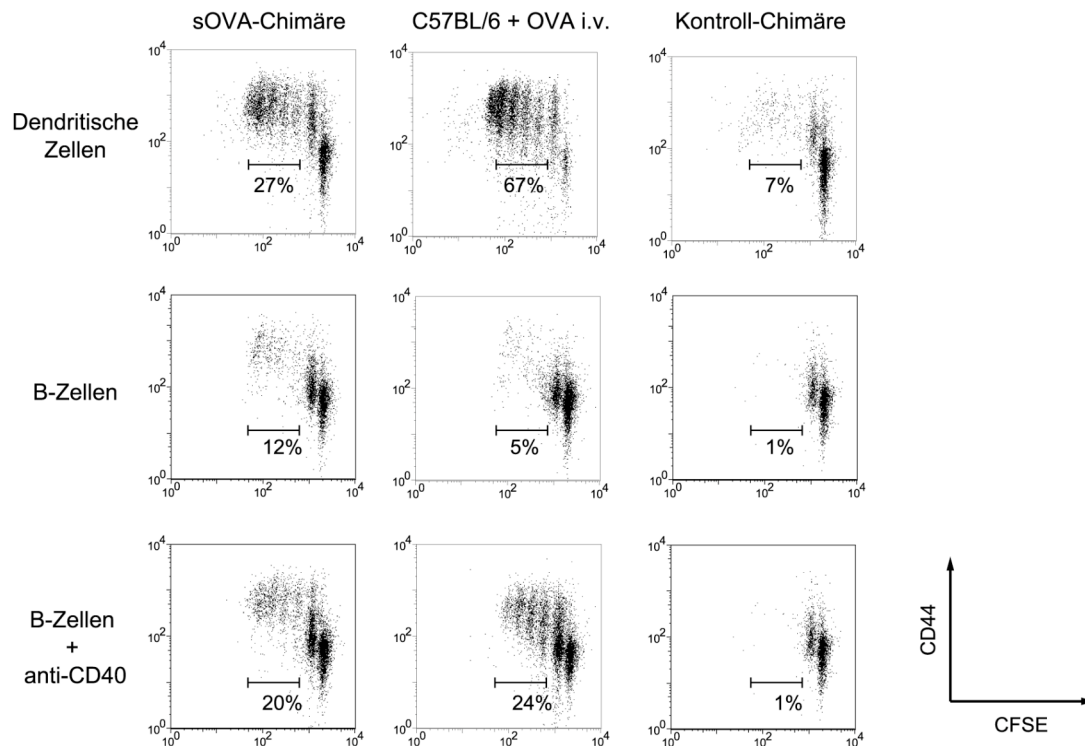


Abb. 28: *In-Vitro*-Kreuzpräsentationstest.  $4 \times 10^5$  CD11c-positive Dendritische Zellen und CD19-positive B-Zellen wurden aus der Milz von sOVA- oder Kontroll-Chimären isoliert und *in vitro* für 48 Stunden mit  $1 \times 10^6$  CFSE-markierten OT-1-T-Zellen inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienten Dendritische Zellen und B-Zellen aus einer C57BL/6-Maus, welche zwölf Stunden zuvor mit  $100 \mu\text{g}$  OVA i.v. injiziert worden war. Die Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die angegebenen Prozentsätze beziehen sich auf OT-1-T-Zellen, welche sich mehr als einmal geteilt haben.

Die Daten zeigen, dass einerseits B-Zellen das Antigen direkt CD8-T-Zellen präsentieren können und dass andererseits das Antigen auch von Dendritischen Zellen aufgenommen und kreuzpräsentiert werden kann. Folglich kann diese indirekte Antigenpräsentation zur Tolerisierung von CD8-T-Zellen beitragen.

Um diese Ergebnisse *in vivo* zu validieren, wurden HSPC aus  $\mu\text{MT}$ -Mäusen mit SIN-CD19-sOVA-W transduziert und in letal bestrahlte C57BL/6-Mäuse transferiert.  $\mu\text{MT}$ -Mäuse können kein membranständiges IgM-Molekül exprimieren, weshalb die B-Zellentwicklung

auf Ebene der Prä-B-Zellen blockiert ist (Kitamura et al. 1991). Dies bedeutet, dass im Knochenmark dieser Mäuse noch eine Population CD19-positiver (2 - 3%) und damit sOVA-produzierender Zellen existiert, jedoch keine reifen B-Zellen mehr. Die Prä-B-Zellen werden ständig produziert, sterben jedoch ab, da sie ihre weitere Entwicklung aufgrund eines fehlenden Signals vom Prä-B-Zellrezeptor nicht vollziehen können. Als Positiv-Kontrolle für die Tolerisierung von OVA-spezifischen T-Zellen dienten C57BL/6-Mäuse, die mit SIN-CD19-sOVA-W-transduzierten HSPC aus C57BL/6-Mäusen rekonstituiert worden waren. Um auszuschließen, dass eine mögliche fehlende Expansion und zytotoxische Aktivität OVA-spezifischer CD8-T-Zellen auf das Fehlen von reifen B-Zellen zurückzuführen ist, wurde eine Gruppe mit  $\mu$ MT-HSPC transplantiert, welche mit virusfreiem Medium transduziert worden waren. Nach erfolgter Rekonstitution wurden die Chimären mit  $2 \times 10^6$  pfu HSV-OVA oder HSV-GFP immunisiert. An Tag sieben nach der Immunisierung wurde die Frequenz OVA-spezifischer CD8-T-Zellen durch eine H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL-Tetramer-Analyse bestimmt. Ferner wurde an Tag acht ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Ein Vergleich der Frequenz Tetramer-positiver CD8-T-Zellen im peripheren Blut an Tag null und sieben nach der Immunisierung, sowie zwischen den einzelnen Gruppen an Tag sieben, zeigte keine signifikante Expansion OVA-spezifischer T-Zellen in OVA-exprimierenden  $\mu$ MT-Mäusen (Abb. 29a). Allein kontrolltransduzierte  $\mu$ MT-Chimären wiesen eine signifikante Expansion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen im peripheren Blut an Tag sieben nach der Immunisierung auf. Dies zeigt auch, dass die fehlende Expansion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen in sOVA/ $\mu$ MT-Chimären nicht auf das Fehlen von reifen B-Zellen zurückzuführen ist. Der *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest (Abb. 29b) bestätigte die Ergebnisse, da nur die HSV-OVA-immunisierten  $\mu$ MT-Kontrollchimären SIINFEKL-beladene Zielzellen eliminieren konnte. Hingegen zeigten OVA-exprimierende  $\mu$ MT- und C57BL/6-Chimären keine zytotoxische Aktivität.

Diese Daten zeigen, dass B-Zellen das Antigen den T-Zellen direkt präsentieren können. Zum anderen wurde deutlich, dass Dendritische Zellen das Antigen aufnehmen und kreuzpräsentieren, wobei eine unspezifische Expression des Antigens in Dendritischen Zellen ausgeschlossen werden konnte. Die Experimente im  $\mu$ MT-System lassen vermuten, dass die indirekte Präsentation des Antigens durch Dendritische Zellen bereits ausreichend ist, um ein polyklonales CD8-T-Zellrepertoire zu tolerisieren.

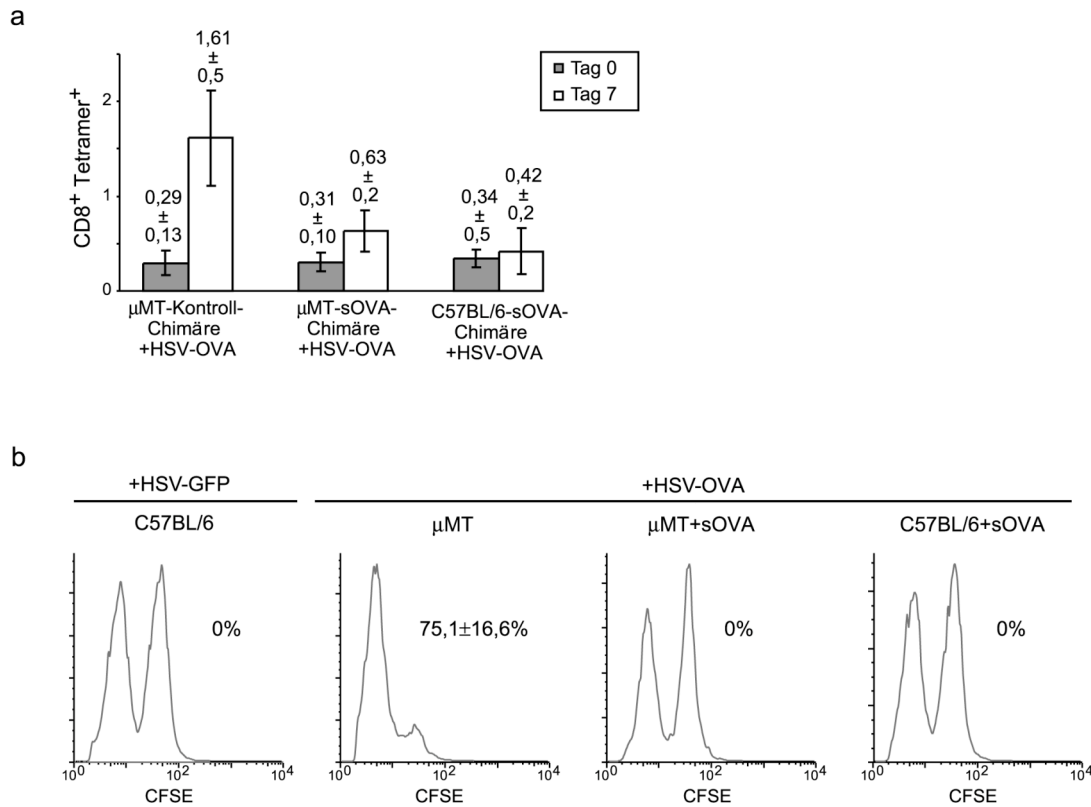


Abb. 29: Toleranzinduktion in  $\mu$ MT-Mäusen. HSPC aus  $\mu$ MT- oder C57BL/6-Mäusen wurden mit SIN-CD19-sOVA-W bzw. virusfreiem Medium transduziert und Knochenmarkschimären generiert. Die Chimären oder C57BL/6-Mäuse wurden mit  $2 \times 10^6$  pfu HSV-OVA oder HSV-GFP immunisiert. a) Die Frequenz Tetramerpositiver (H2Kb:SIINFEKL) CD8-T-Zellen wurde an Tag null und sieben im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. b) An Tag acht wurde ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

### 5.4.3 Tolerisierung von CD8-Gedächtniszellen

Um zu überprüfen, ob nicht nur naive CD8-T-Zellen sondern auch Gedächtniszellen tolerisiert werden können, wurden OT-1-T-Zellen (Ly5.1<sup>+</sup>) *in vitro* für vier Tage auf kongenen SIINFEKL-beladenen Ly5.2-positiven Milzzellen stimuliert (Abb. 30). Nach vier Tagen bestand die Kultur ausschließlich aus Ly5.1-positiven Zellen, da die aktivierten Effektorzellen alle peptidbeladenen Ly5.2-positiven Milzzellen eliminiert hatten (Daten nicht gezeigt). Um Gedächtniszellen zu generieren wurden  $20 \times 10^6$  der Effektorzellen in kongene Ly5.2-positive Rezipienten transferiert, welche zuvor mit 600 rad konditioniert worden waren. Nach drei Wochen wurden die OT-1-T-Zellen (Ly5.1<sup>+</sup>) aus der Milz und den Lymphknoten isoliert, indem alle Ly5.2-positiven Zellen depletiert wurden.

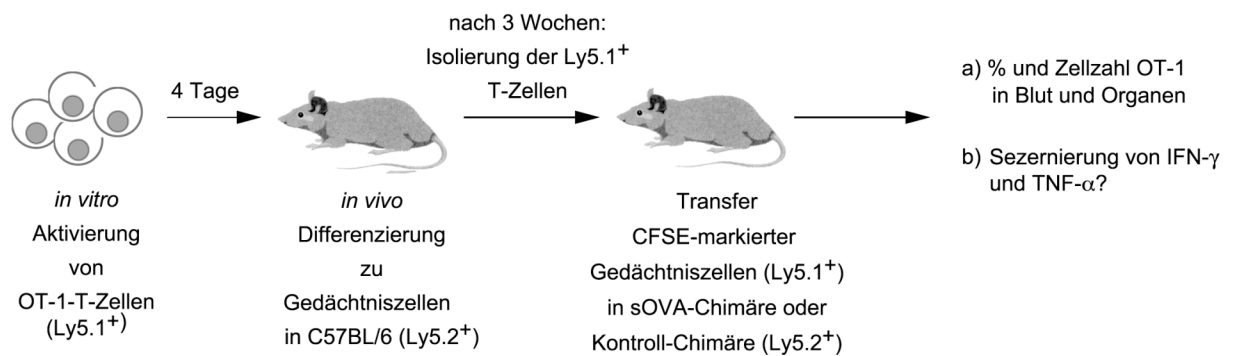


Abb. 30: Schematische Übersicht des experimentellen Aufbaus. OT-1-T-Zellen, die das Ly5.1-Allel exprimieren wurden *in vitro* auf peptidbeladenen Ly5.2-positiven Milzzellen für 4 Tage stimuliert. Anschließend wurden die Ly5.1-positiven Effektorzellen in C57BL/6-Mäuse (Ly5.2<sup>+</sup>) transferiert und zu Gedächtniszellen differenziert. Nach drei Wochen wurden die Ly5.1-positiven OT-1-T-Zellen isoliert, mit CFSE markiert und in sOVA- oder Kontroll-Chimären transferiert, welche das Ly5.2-Allel exprimieren. Die Frequenz und absolute Zellzahl der OT-1-Gedächtniszellen wurde im peripheren Blut und verschiedenen hämatopoetischen Organen bestimmt. Desweiteren wurden die OT-1-T-Zellen auf ihre Fähigkeit zur Sezernierung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  überprüft.

Im Vergleich zu Effektorzellen weisen Gedächtniszellen ein einheitlicheres und höheres Expressionsprofil von Ly6C auf (Kreuwel et al. 2002). Eine durchflusszytometrische Analyse der T-Zellen nach der viertägigen *In-Vitro*-Aktivierung und der dreiwöchigen *In-Vitro*-Differenzierungsphase bestätigte den entsprechenden Ly6C-Phänotyp (Abb. 31a). Es wurden  $2 \times 10^6$  CFSE-markierte OT-1-Gedächtniszellen (Ly5.1<sup>+</sup>) in sOVA-Chimären (Ly5.2<sup>+</sup>) oder Kontroll-Chimären (Ly5.2<sup>+</sup>) transferiert. An Tag zwei und vier nach Transfer konnte eine Teilung CFSE-markierter OT-1-T-Zellen in den sOVA-Chimären beobachtet werden (Abb. 31b, Tag vier ist gezeigt). Die Frequenz der OT-1-T-Zellen war im Vergleich zu Kontroll-Chimären in sOVA-Chimären vergleichbar, jedoch nicht höher. Dies weist darauf hin, dass die OT-1-T-Zellen in diesen Chimären nicht akkumulierten, da ansonsten eine erhöhte Frequenz zu erwarten gewesen wäre. Vierzehn Tage nach T-Zelltransfer wurden die Milz, inguinalen Lymphknoten und das Knochenmark isoliert, um die Anzahl der Ly5.1-positiven CD8-T-Zellen zu bestimmen. In vier von sechs sOVA-Chimären wurden über 90% der Gedächtniszellen deletiert. Im Vergleich zu Kontroll-Chimären wurden in der Milz und den Lymphknoten eine neun- bzw. 37-fach geringere Anzahl an Ly5.1-positiven CD8-T-Zellen gemessen (Abb. 31c Milz und Lymphknoten, sOVA-Chimäre linker Balken).

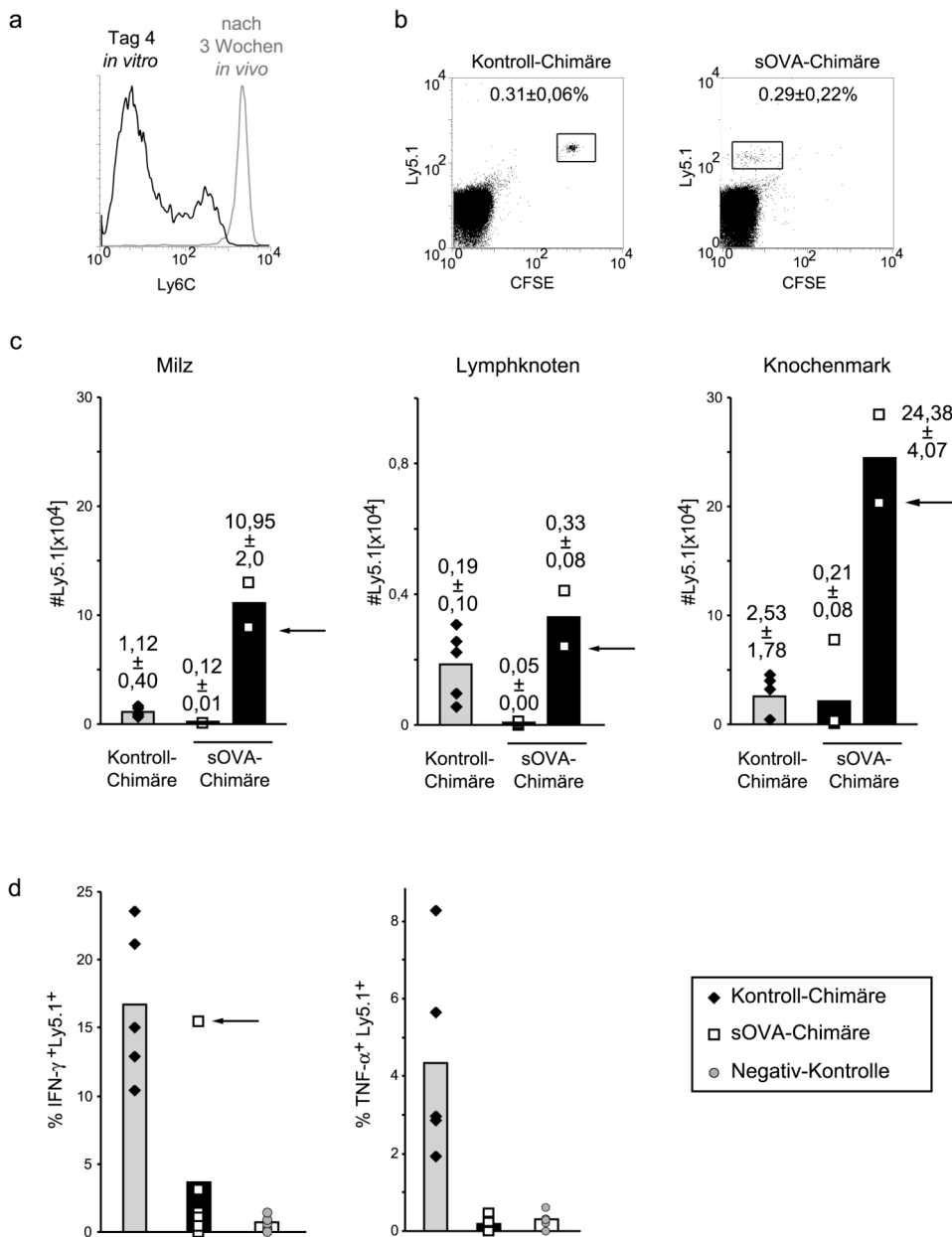


Abb. 31: Tolerisierung von CD8-Gedächtniszellen. Naive Ly5.1-positive OT-1-T-Zellen wurden *in vitro* in Gegenwart von kongenen SIINFEKL-beladenen C57BL/6-Milzzellen (Ly5.2<sup>+</sup>) aktiviert. Nach vier Tagen wurden die OT-1-T-Zellen (Ly5.1<sup>+</sup>) in C57BL/6-Tiere (Ly5.2<sup>+</sup>; 20x10<sup>6</sup> OT-1-T-Zellen/Empfänger) transferiert und zu Gedächtniszellen differenziert. Diese wurden nach drei Wochen aus Milz und Lymphknoten durch Depletion aller Ly5.2<sup>+</sup> Zellen isoliert. a) Durchflusszytometrische Analyse der Ly6C-Expression von OT-1-T-Zellen vor und nach der dreiwöchigen Differenzierungsphase. sOVA- bzw. Kontroll-Chimären (C57BL/6) wurden mit 2x10<sup>6</sup> CFSE-markierten Gedächtniszellen transferiert (je n=5). b) Vier Tage nach dem T-Zelltransfer wurde im peripheren Blut die Frequenz der OT-1-T-Zellen innerhalb der CD8-T-Zellpopulation bestimmt. c) Gezeigt ist die Anzahl der Ly5.1-positiven Zellen in der Milz, den inguinalen Lymphknoten und im Knochenmark 14 Tage nach Transfer der Gedächtniszellen. d) Der Prozentsatz IFN-γ- oder TNF-α-sezierender Ly5.1-positiver CD8-T-Zellen wurde in der Milz bestimmt. Eine sOVA-Chimäre wurde mit einem Pfeil zur besseren Nachverfolgung gekennzeichnet. □, ● und ◆ stellen einzelne Tiere einer Gruppe dar, die Balken geben den jeweiligen Durchschnittswert der Gruppe an.

Im Knochenmark wurde hingegen nur bei drei Tieren dieser Gruppe ein mit den Daten aus der Milz und den Lymphknoten übereinstimmendes Bild gefunden (Abb. 31c, Knochenmark, sOVA-Chimäre linker Balken). Eine der Chimären, welche eine Deletion der Ly5.1-positiven CD8-T-Zellen in Milz und Lymphknoten aufwies, zeigte eine erhöhte Anzahl dieser Zellen im Knochenmark ( $7,75 \times 10^4$ ). In den restlichen zwei Tieren der sechs sOVA-Chimären hatten die Gedächtniszellen expandiert, da in der Milz und dem Knochenmark eine zehnmal und in den Lymphknoten eine zweimal höhere Anzahl an Ly5.1-positiven CD8-T-Zellen gemessen wurde wie in den Kontroll-Chimären (Abb. 31c sOVA-Chimäre rechter Balken).

In Ergänzung zu den OT-1-T-Zellzahlen, wurden die Milzzellen *in vitro* mit Peptid für fünf Stunden restimuliert und der Prozentsatz IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -sezernierender OT-1-T-Zellen gemessen. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Milzzellen aus Kontroll- und sOVA-Chimären. Im Durchschnitt wiesen die sechs sOVA-Chimären 78% bzw. 96% weniger IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -produzierende Gedächtniszellen auf (Abb. 31d). Obwohl in zwei der sechs sOVA-Chimären eine Expansion der OT-1-T-Zellen in der Milz, den Lymphknoten und dem Knochenmark deutlich war (Abb. 31c), wurden auch in diesen Tieren prozentual weniger IFN- $\gamma$ - oder TNF- $\alpha$ -produzierende OT-1-T-Zellen in der Milz gemessen. Mit einem Pfeil ist jene sOVA-Chimäre gekennzeichnet, welche eine normale Frequenz von IFN- $\gamma$ -produzierenden OT-1-T-Zellen bei einer gleichzeitig reduzierten Frequenz von TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen aufwies.

Zusammengefasst belegen diese Daten, dass eine Tolerisierung von CD8-Gedächtniszellen durch die selektive Antigenexpression in B-Zellen möglich und der operierende Mechanismus, analog zur Toleranzinduktion in naiven CD8-T-Zellen, die klonale und funktionelle Deletion OVA-spezifischer T-Zellen ist.

#### **5.4.4 Auswirkung einer subletalen Bestrahlung auf die Toleranzinduktion**

Für eine potentielle Stammzelltherapie von Autoimmunkrankheiten war es wichtig zu bestimmen, ob eine subletale Bestrahlungsdosis ausreichen würde, um eine periphere CD8-T-Zelltoleranz hervorzurufen. Im Vergleich zu einer letalen Bestrahlung ist die nicht myeloablative, subletale Bestrahlung mit einem schlechteren Anwachsen der HSPC und einem reduzierten Chimerismus verbunden. Die Nebenwirkungen durch die Bestrahlung sind jedoch deutlich reduziert. Es wurden HSPC aus B6SJL-Mäusen (Ly5.1<sup>+</sup>) mit SIN-CD19-sOVA-W oder virusfreiem Medium transduziert. Die Rezipienten der transduzierten HSPC (C57BL/6<sup>+</sup>-Mäuse; Ly5.2<sup>+</sup>) wurden anstatt mit der letalen Dosis von zweimal 550 rad nur mit

einer subletalen, einmaligen Dosis von 550 rad bestrahlt. Anhand des kongenen Markers Ly5 konnte der Prozentsatz der Zellen einer Reihe bestimmt werden, die sich von den endogenen (Ly5.1<sup>-</sup>) oder den transduzierten Stammzellen (Ly5.1<sup>+</sup>) ableiten. Der Chimerismus in der B-Zellreihe betrug in Woche zwölf  $78,6 \pm 9,4\%$  (Kontroll-Chimären) und  $74,1 \pm 11,1\%$  (sOVA-Chimären). In der T-Zellreihe war der Chimerismus mit  $56,6 \pm 8,8\%$  (Kontroll-Chimären) und  $62,8 \pm 13,8\%$  (sOVA-Chimären) niedriger als in der B-Zellreihe (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse für die myeloide Reihe fielen ähnlich aus ( $43,4 \pm 8,6\%$  Kontroll-Chimären und  $44,9 \pm 14,0\%$  sOVA-Chimären, Daten nicht gezeigt). Zwölf Wochen nach der Rekonstitution wurden die Chimären bzw. C57BL/6-Mäuse mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA bzw. HSV-GFP immunisiert (Abb. 32).

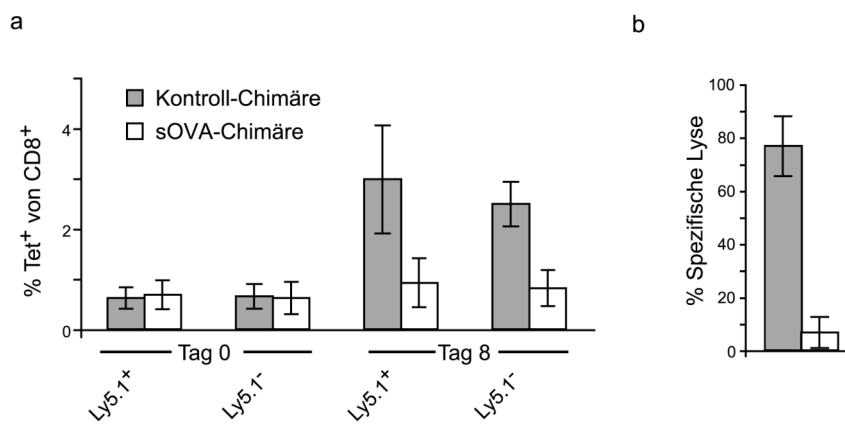


Abb. 32: Toleranzinduktion unter nicht myeloablativen Bedingungen. C57BL/6-Mäuse (Ly5.2<sup>+</sup>) wurden mit 550 rad bestrahlt und mit SIN-CD19-sOVA-W-transduzierten oder kontroll-transduzierten HSPC aus B6SJL-Mäusen (Ly5.1<sup>+</sup>) rekonstituiert. Die Chimären oder C57BL/6-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA oder HSV-GFP immunisiert. a) Die Frequenz Tetramer-positiver (H-2K<sup>b</sup>:SIINFEKL) CD8-T-Zellen wurde an Tag null und acht nach der Immunisierung durchflusszytometrisch bestimmt. b) An Tag neun wurde ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Am Tag der Immunisierung wurde eine ähnliche Frequenz Tetramer-positiver CD8-T-Zellen in den sOVA- bzw. kontrolltransduzierten Chimären gefunden, wie auch innerhalb jeder Chimären-Gruppe in Bezug auf Ly5.1-positive und Ly5.1-negative CD8-T-Zellen (Abb. 32a). An Tag acht nach der Immunisierung wurde nur in den Kontroll-Chimären eine deutliche Expansion Tetramer-positiver, Ly5.1-positiver oder Ly5.1-negativer CD8-T-Zellen beobachtet. Hingegen zeigten OVA-exprimierende Chimären keine Expansion Tetramer-positiver CD8-T-Zellen. Ein *In-Vivo*-Zytotoxizitätstest bestätigte diese Ergebnisse, da im



Gegensatz zu den Kontroll-Chimären mit einer spezifische Lyse von  $76,8 \pm 11,3\%$ , die sOVA-Chimären eine spezifische Lyse von  $6,7 \pm 5,9\%$  aufwiesen (Abb. 32b).

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen auch unter nicht myeloablativen Bedingungen möglich ist.

#### 5.4.5 Quantitative Bestimmung von sOVA

Zur quantitativen Bestimmung von sOVA im Zytoplasma von B-Zellen wurden CD19-positive Zellen aus der Milz von sOVA-Chimären isoliert, welche mit HSPC aus OT-1-Mäusen rekonstituiert worden waren. Alle CD19-negativen Zellen wurden als Nicht-B-Zellen weiter mitgeführt und es wurde mit den respektiven Zellpopulationen ein Western Blot für Ovalbumin durchgeführt. Als Standard für die Sensitivität des Western Blots wurden unterschiedliche Mengen an OVA (5 - 0,2 ng) verwendet. Der Western Blot wurde mit einem gegen Ovalbumin gerichteten monoklonalen Antikörper aus der Maus entwickelt. Obwohl die Detektionsgrenze bei  $<0,2$  ng lag, konnte kein Ovalbumin in B-Zellen und Nicht-B-Zellen (jeweils  $5 \times 10^5$ /Spur) gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Detektion von sOVA im peripheren Blut wurden auf Basis von C57BL/6-HSPC Knochenmarkschimären generiert. Von diesen Tieren (nicht immunisiert) wurde Serum gewonnen und im ELISA getestet. Trotz der niedrigen Detektionsgrenze ( $\geq 1$  und  $\leq 10$  ng/ml OVA), konnte auch hier im Vergleich zu Kontroll-Chimären kein OVA im Serum nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die in B-Zellen exprimierten bzw. sezernierten Mengen müssen folglich sehr gering sein.

#### 5.4.6 B-Zelltoleranz

Um zu überprüfen, ob die Expression von sOVA in B-Zellen auch zur Tolerisierung von B-Zellen führt, wurden sOVA-Chimären auf Basis von C57BL/6-HSPC auf die Existenz von Antikörpern gegen Ovalbumin vor und nach einer Immunisierung mit OVA getestet. Als Kontrolle wurde eine separate Gruppe von sOVA- und Kontroll-Chimären mit einem irrelevanten Protein (KLH, *keyhole-limpet hemocyanin*) immunisiert. Vor der Immunisierung wiesen sowohl sOVA- als auch die Kontroll-Chimären im ELISA keine OVA- oder KLH-spezifischen Antikörper vom Isotyp IgM, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> auf (Daten nicht gezeigt). Die Chimären wurden mit 300  $\mu$ g OVA oder KLH in CFA immunisiert. 21 Tage nach der Erstimmunisierung wurden die Tiere mit 300  $\mu$ g OVA oder KLH in IFA erneut immunisiert.

Serum wurde an Tag sieben und 34 nach der Erstimmunisierung gewonnen. OVA- und KLH-spezifische IgM-, IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Antikörper wurden mittels ELISA bestimmt. An Tag sieben konnten im Serum der sOVA- wie auch Kontroll-Chimären nur KLH-spezifische, jedoch keine OVA-spezifischen IgM Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 33 und Daten nicht gezeigt). An Tag 34 wurden in beiden Gruppen die für eine T<sub>h2</sub>-Antwort typischen KLH- und OVA-spezifischen Antikörper vom Isotyp IgG<sub>1</sub> gefunden (Abb. 33).

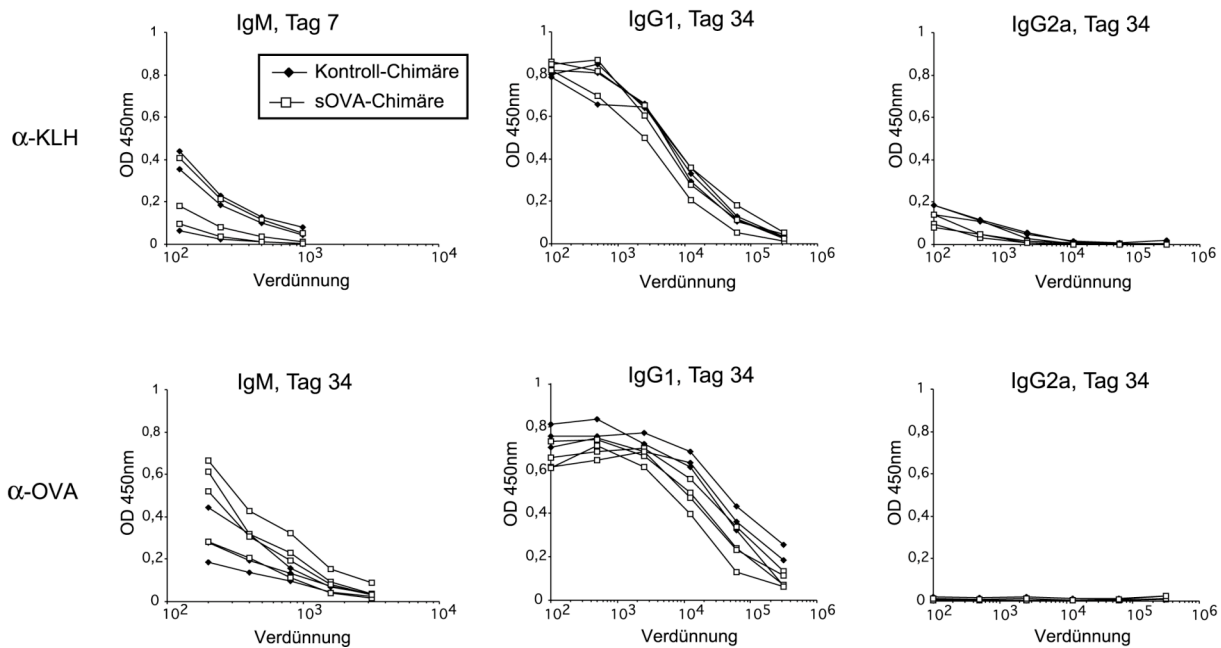


Abb. 33: Induktion einer Antikörperantwort in sOVA-Chimären. Kontroll- und sOVA-Chimären wurden mit 300  $\mu$ g Ovalbumin oder KLH in CFA immunisiert. An Tag 21 nach der ersten Immunisierung wurde erneut mit 300  $\mu$ g OVA oder KLH in IFA immunisiert. Serum wurde an Tag null, sieben und 34 gewonnen. Die Produktion von OVA- oder KLH-spezifischen IgM-, IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Antikörpern wurde im ELISA nachgewiesen.

Die OVA-immunisierten Chimären wiesen keine IgG<sub>2a</sub>-Antikörper auf. Lediglich die KLH-immunisierten Tiere zeigten eine schwache Antwort. Wiesen sOVA- und Kontroll-Chimären an Tag 7 keine OVA-spezifischen IgM-Antikörper auf, so konnten diese an Tag 34 gemessen werden. Eine Titration der Seren für OVA- und KLH-spezifische IgM-, IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Antikörper ergab keinen quantitativen Unterschied zwischen den sOVA- und Kontroll-Chimären. Damit konnte gezeigt werden, dass OVA-exprimierende Chimären eine normale Antikörperantwort gegen ein irrelevantes Antigen wie KLH generieren können. Ferner führt die Expression von sOVA in B-Zellen zu keiner Toleranzinduktion in diesen.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Einfluss von WPRE auf die Eigenschaften von SIN-Vektoren

Um einen retroviralen Vektor für einen effizienten Gentransfer und eine gezielte Transgenexpression in B-Zellen zu entwickeln, wurde systematisch der Einfluss von WPRE auf den viralen Titer und die Transgenexpression eines SIN-Vektors in Kombination mit einem ubiquitären oder zellspezifischen Promotor analysiert. WPRE erhöhte den Titer beider Vektoren (Abb. 8 und 11). Dies lässt vermuten, dass WPRE die Menge der vom 5'LTR regulierten genomischen RNA erhöht. Somit konnten Vektorüberstände produziert werden, deren Titer eine Applikation für die Transduktion primärer hämatopoetischer Stammzellen zuließ, ohne diese vorher konzentrieren zu müssen. Bei einer Konzentrierung retroviraler Überstände werden nicht nur infektiöse virale Partikel angereichert, sondern auch unerwünschte Faktoren, wie z.B. leere und defekte Viruspartikel oder fötales Kälberserum, welche die Transduktion und das Rekonstitutionspotential der Stammzellen negativ beeinflussen (Kuhlcke et al. 2002). Der negative Effekt der Deletion des Promotor/Enhancers im LTR von gammaretroviralen SIN-Vektoren wird möglicherweise durch die starke Sekundärstruktur des WPRE kompensiert (Cupelli et al. 1998; Furger et al. 2001; Moreau-Gaudry et al. 2001; Yee et al. 1987; Zaiss et al. 2002). Der positive Einfluss von WPRE auf den viralen Titer von SIN-Vektoren mit SFFV fiel signifikant höher aus als für gammaretrovirale LTR-Vektoren (Schambach et al. 2000). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen gammaretroviralen SIN-Vektoren konnte für lentivirale keine Erhöhung des Titers durch die Verwendung von WPRE beobachtet werden, (Donello et al. 1998; Mautino and Morgan 2002), da dieser weniger anfällig gegenüber Deletionen in der U3-Region des LTRs sind (Miyoshi et al. 1998; Naldini 1998; Zufferey et al. 1998). Wie anhand der Ergebnisse für den B-zellspezifischen Promotor deutlich wird, scheint der Einfluss von WPRE auf den viralen Titer stark vom Promotor abzuhängen (vgl. Abb. 8 und 11). Dies könnte auf eine fehlende Promotorinterferenz in der Verpackungszelllinie zurückzuführen sein: da der CD19-Promotor als B-zellspezifischer Promotor in diesen Zellen nicht aktiv ist, können nur LTR-Transkripte produziert werden. Im Fall des SIN-Vektors mit SFFV kann jedoch die Transkription von zwei Promotor-Bereichen gesteuert werden: zum einen vom LTR und zum anderen vom internen Promotor.

Überraschenderweise wurde eine erhöhte Transgenexpression für den SIN-Vektor mit SFFV und WPRE nur in Fibroblasten *in vitro*, jedoch nicht in hämatopoetischen Zellen *in vivo* beobachtet. Eine Analyse der Milz und die Langzeitbeobachtung des peripheren Bluts zeigten

eine signifikant erniedrigte Transgenexpression in B- und T-Zellen (Tabelle 3). Der Einfluss von WPRE auf die Transgenexpression scheint sehr stark vom zellulären Kontext abzuhängen, da, im Gegensatz zu den Daten für B-Zellen und T-Zellen, kein Effekt in myeloiden Zellen beobachtet wurde. Die teilweise kontroverse Datenlage, welche sowohl einen negativen (Ramezani et al. 2000; Salmon et al. 2000) wie auch positiven (Gropp et al. 2003; Moreau-Gaudry et al. 2001; Yam et al. 2002; Zufferey et al. 1999) Einfluss auf die Transgenexpression lentiviraler SIN- und LTR-Vektoren in Abhängigkeit vom Promotor und Zelltyp beschreibt, spricht ebenfalls für eine Kontext-Abhängigkeit.

Das nah verwandte posttranskriptionell regulatorische Element des Hepatitis Virus (HPRE) interagiert mit Proteinen im Nukleus der Wirtszelle, welche direkt oder indirekt in den Transport der ungespleißten RNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma involviert sind (Huang et al. 1996). Für WPRE wurde gezeigt, dass es den RNA-Transport CRM-1 abhängig wie auch CRM-1 unabhängig beeinflusst (Popa et al. 2002). Zellen unterschiedlicher Reihen gebrauchen möglicherweise, je nach funktionellem und entwicklungsbedingtem Status, diese Wege anders. Eine toxische Wirkung einer hohen eGFP-Expression, welche eine Selektion von niedrig exprimierenden Klonen bewirken könnte, wäre mit einem negativen Einfluss von WPRE assoziiert. Dies ist sehr unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine ähnliche eGFP-Expressionsstärke erwartet würde, jedoch nicht eine konsistent und signifikant niedrigere Expression in der Vektorgruppe mit WPRE. Des weiteren zeigte die Gruppe, welche mit den unter hohen MOI-Bedingungen transduzierten HSPC transplantiert worden war, eine höhere eGFP-Expression, was ebenso gegen einen möglichen toxischen Effekt von WPRE spricht (Abb. 9 und Daten nicht gezeigt).

Für den B-zellspezifischen Vektor mit und ohne WPRE konnte kein Unterschied bzgl. der Transgenexpression gezeigt werden (Abb. 11). Der zweifach erhöhte virale Titer des WPRE-Vektors wirkte sich in einer höheren MOI aus und führte zu einer zweifach erhöhten Frequenz transgener B-Zellen *in vivo*. Folglich könnte der negative Einfluss von WPRE auf die Transgenexpression in lymphoiden Zellen durch eine höhere MOI maskiert und somit unabhängig vom internen Promotor sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss von WPRE auch vom Promotor abhängt (Ramezani et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gammaretrovirale SIN-Vektoren mit WPRE kombiniert werden sollten, um den viralen Titer und damit die Frequenz transduzierter Zellen zu steigern, jedoch nicht unter dem Gesichtspunkt einer höheren Transgenexpression in primären hämatopoetischen Zellen. WPRE sollte daher nicht nur im Zusammenhang mit der cDNA (Schambach et al. 2000), sondern auch mit unterschiedlichen Promotoren und vor

allem Zielzellen getestet werden. Eine geringfügige Reduktion der Transgenexpression kann oftmals unter dem Gesichtspunkt eines signifikant erhöhten Titers und einer damit erhöhten Frequenz transduzierter Zellen toleriert werden.

## **6.2 Entwicklung eines SIN-Vektors mit B-zellspezifischer Transgenexpression**

Eine zellspezifische Transgenexpression in hämatopoetischen Zellen durch die Verwendung retroviraler Vektoren wurde für erythroide (Grande et al. 1999) und MHC-II-positive (Cui et al. 2002) Zellen berichtet. Kürzlich wurde auch in CD4-Zellen eine gezielte Transgenexpression durch die Verwendung eines lentiviralen Vektors in Kombination mit der regulatorischen Sequenz des CD4-Gens erreicht (Marodon et al. 2003). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein Fragment von 999 bp des humanen CD19-Promotors in Kombination mit einem SIN-Vektor ausreichend ist, um die Transgenexpression spezifisch auf B-Zellen während ihrer gesamten Entwicklung in primären und sekundären lymphatischen Organen zu beschränken (Abb. 11 und 12).

Die Anwendung von Vektoren mit einem internen Promotor kann durch einen niedrigen viralen Titer oder eine transkriptionelle Interferenz limitiert sein. Daher wurden Hybrid-LTR-Vektoren entwickelt, um diese Probleme zu umgehen. Beide, Hybrid-LTR-Vektoren und Vektoren mit einem internen Promotor, haben Vor- und Nachteile, so dass keine allgemeingültige Anwendbarkeit abgeleitet werden kann. Daher müssen diese in Abhängigkeit vom Promotor und der Zielzelle empirisch getestet werden (Miller and Whelan 1997). Es konnte keine B-zellspezifische Expression erreicht werden, wenn der CD19-Promotor im Kontext eines Hybrid-LTR-Vektors verwendet wurde (Abb. 16 und 17). Dabei schien der Hybrid-LTR-Vektor in Kombination mit einem 347-bp-Fragment des Promotors eine deutlich höhere Aktivität in Zellen lymphoiden als myeloiden Ursprungs zu besitzen. Titrationsexperimente zeigten, dass dies nicht auf eine zu hohe MOI während der Transduktion der HSPC zurückzuführen war (Abb. 17). Hybrid-LTR-Vektoren wurden erfolgreich für eine gezielte Transgenexpression in erythroiden Zellen (Lotti et al. 2002), CD4-T-Zellen (Zhao-Emonet et al. 2000), endothelialen (Jager et al. 1999) oder anderen (Diaz et al. 1998) Zellen verwendet. Es zeigte sich jedoch auch, dass unterschiedliche Zelllinien eine differentielle Abhängigkeit der Transkription vom viralen Enhancer und proximalen Promotor im LTR aufweisen können (Richardson et al. 2004). Dies bedeutet, dass das Ausmaß, bis zu welchem die Enhancer und Promotor-Sequenzen deletiert werden müssen,

variieren kann, um eine zell-oder gewebsspezifische Expression von einem heterologen, im LTR-ansässigen Promotor zu erlauben. Unklar ist, ob diese Ergebnisse auch auf primäre Zellreihen übertragbar sind. In den Hybrid-LTR-Vektoren ist, im Gegensatz zu den verwendeten SIN-Vektoren, die TATA-Box im LTR nicht deletiert. Inwiefern eine Deletion der TATA-Box die transkriptionelle Spezifität der Hybrid-LTR-Vektoren verbessern würde, bleibt zu ermitteln.

Im Rahmen einer zweiten Transduktion mit dem B-zellspezifischen SIN-Vektor, nahm die Frequenz transgener Zellen *in vivo* interessanterweise um das Zweifache zu, erhöhte sich jedoch nicht mit einer weiteren Transduktion (vgl. Abb. 11 und 13). Offenbar waren alle transduzierbaren, d.h. sich teilenden Zellen, mit zwei Transduktionen erreicht worden. Im Rahmen einer Transduktion kann eine Effizienz von höchstens 50% erreicht werden, da sich die Integration des Retrovirus in das Genom der Wirtszelle nach Replikation der Wirts-DNA vollzieht. Somit kann entweder das Genom der Mutter- oder Tochterzelle den Vektor enthalten, jedoch nicht beide. Überraschenderweise wurde eine erhöhte unspezifische Transgenexpression in CD19-negativen Zellen im Zuge der dritten Transduktion festgestellt (Abb. 13). Dies lässt vermuten, dass durch die dritte Transduktion zusätzliche retrovirale Kopien in bereits transgene Zellen eingebracht wurden. Dies ist mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des retroviralen Vektors assoziiert, in der Nähe eines aktiven zellulären Enhancers zu inserieren. Eine unspezifische Transgenexpression wurde auch in transgenen Mäusen beobachtet, in welchen ein Promotorbereich von 4,2 kb verwendet wurde und welche mehrere Kopien des transgenen Konstrukts besitzen (A. Nopora, unveröffentlichte Beobachtung). Daher muss in dem hier präsentierten Ansatz zugunsten einer B-zellspezifischen Transgenexpression eine moderate Frequenz transgener B-Zellen akzeptiert werden. Lutzko *et al.* konnten durch die Verwendung eines B-zellspezifischen Enhancers mit der zugehörigen Matrix-Verankerungs-Region (*matrix attachment region*, MAR) die Transgenexpression von einem ubiquitären viralen oder zellulären Promotor spezifisch und positionsunabhängig in B-Zellen erhöhen (Lutzko *et al.* 2003). Es ist möglich, dass diese MAR in Kombination mit dem B-zellspezifischen Enhancer den humanen CD19-Promotor im SIN-Vektor vom Einfluss der chromosomalen Umgebung isolieren und seine relativ schwache Expression verbessern könnte.

Die Sequenz der Promotorregion des humanen und murinen CD19-Gens sind nicht völlig identisch (Kozmik *et al.* 1992). Studien in transgenen Mäusen, welche beide Gene koexprimieren, zeigten eine unterschiedliche Regulation auf (Sato *et al.* 1997). Die Expression des humanen CD19-Gens nahm mit fortschreitender B-Zellreifung zu und

korrelierte mit den beschriebenen Veränderungen während der humanen B-Zellentwicklung. Die Expressionsstärke des murinen CD19-Gens hingegen wurde in einem bestimmten Entwicklungsstadium hoch reguliert. In Zusammenhang mit dem B-zellspezifischen Vektor wurde eine durchweg einheitliche Expression des Transgens beobachtet (Abb. 12). Zusätzliche regulatorische Elemente in der Promotorregion und der kodierenden Region selbst sind vermutlich für die korrekte transkriptionelle Kontrolle des humanen CD19 Locus nötig. Diese könnten wiederum für die Feinabstimmung der retroviralen B-zellspezifischen Transgenexpression interessant sein.

Eine wichtige Anforderung an retrovirale Vektoren ist eine stabile und lang anhaltende Expression des Transgens. In Abwesenheit eines Selektionsdrucks konnte für den B-zellspezifischen SIN-Vektor eine Langzeit-Expression des Transgens in B-Zellen beobachtet werden. Allerdings wurde ein Jahr nach der Knochenmarkstransplantation in 75% der Fälle eine reduzierte Anzahl transgenexprimierender B-Zellen gefunden. In Relation zur normalen Lebensspanne einer Labor-Maus von ein bis zwei Jahren, war jedoch die Abnahme in den meisten Fällen nicht zu groß (Abb. 14). In keinem der Fälle wurde ein völliger Verlust der Transgenexpression gefunden, obwohl dies schon für andere Vektoren berichtet wurde (Challita and Kohn 1994; Lange and Blankenstein 1997). Damit konnte gezeigt werden, dass der B-zellspezifische SIN-Vektor geeignet ist, um B-Zellen permanent zu modifizieren, wodurch sich diverse Anwendungsmöglichkeiten eröffnen: detaillierte Untersuchungen über die Funktion und Rolle der B-Zelle bei der Toleranzinduktion und Immunität oder die Auswirkung verschiedener Moleküle auf die Funktionalität der B-Zelle. Weiterhin sind therapeutische Konzepte auf Basis von genetisch modifizierten B-Zellen denkbar.

### **6.3 Experimenteller Ansatz zur *In-Vivo*-Tolerisierung von CD8-T-Zellen**

Zahlreiche Studien belegen, dass B-Zellen, welche das Antigen im Kontext von MHC-II präsentieren, Toleranz in CD4-T-Zellen induzieren können (El-Amine et al. 2000; Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995). Einige dieser Ansätze basieren auf der rezeptorvermittelten Aufnahme des Antigens durch B-Zellen (Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995). Unklar ist, ob B-Zellen auch CD8-T-Zellen tolerisieren können. Zur Klärung dieser Frage musste ein experimenteller Ansatz gewählt werden, in welchem B-Zellen das Antigen im Zytosol transkribieren und somit auf MHC-I präsentieren, da eine effektive, zu Dendritischen Zellen vergleichbare Kreuzpräsentation des Antigens durch B-Zellen nur unter *In-Vitro*-

Bedingungen stattzufinden scheint (Heit et al. 2004; Ke and Kapp 1996). Da die Persistenz des Antigens, d.h. dessen kontinuierliche Präsenz, für die lebenslange antigenspezifische Toleranz nötig zu sein scheint (Pape et al. 1998; Redmond et al. 2003; Rocha et al. 1995; Rocha and von Boehmer 1991), wurde ein Ansatz gewählt, in welchem eine kontinuierliche und lang anhaltende Expression des Antigens gewährleistet ist. Indem hämatopoetische Stammzellen mit einem retroviralen Vektor transduziert werden, welcher eine B-zellspezifische Transgenexpression erlaubt, führt dies zu einer kontinuierlichen Generierung von antigenexprimierenden und potentiell tolerogenen B-Zellen.

### **6.3.1 *In-Vivo*-Tolerisierung eines polyklonalen oder transgenen CD8-T-Zellrepertoires**

Die Experimente im polyklonalen System (Abb. 20) zeigten, dass eine selektive Antigenexpression in B-Zellen zur Tolerisierung von CD8-T-Zellen führt. Dies wurde anhand der fehlenden Expansion sowie zytotoxischen Aktivität OVA-spezifischer T-Zellen nach Immunisierung bestimmt. Diese Daten belegen den toleranten Status der CD8-T-Zellpopulation. In diesem Ansatz kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob vor der Immunisierung OVA-spezifische T-Zellen existierten, da deren Frequenz unter der Detektionsgrenze von MHC-I:Peptid-Tetrameren lag. Anhand der Analysen im OT-1 System konnten die zugrunde liegenden Mechanismen der Toleranzinduktion herausgearbeitet werden. Es war unwahrscheinlich, dass die Antigenexpression in B-Zellen eine Auswirkung auf das Schicksal von Thymozyten haben würde, da B-Zellen einen sehr kleinen Anteil von ca. 0,01% der Thymuszellen repräsentieren. Ferner wurde bereits gezeigt, dass B-Zellen ausreichen, um superantigenbindende CD4-T-Zellen, aber nicht CD8-T-Zellen, im Thymus klonal zu deletieren (Kleindienst et al. 2000). Dies konnte im Thymus durch die im Gegensatz zur Milz fehlende klonale Deletion und reduzierte Frequenz von OT-1-T-Zellen bestätigt werden (vgl. Abb. 22 und 23). Eine fehlende Deletion OVA-spezifischer CD8-T-Zellen im Thymus kann jedoch nicht deren Anergisierung ausschließen, was jedoch aufgrund der sehr kleinen thymischen B-Zellpopulation unwahrscheinlich ist. Im TCR-transgenen System wurde anhand der reduzierten Zellzahl und Frequenz der OT-1-T-Zellen (Abb. 23) sowie der reduzierten Zellzahl der CD8-T-Zellen (Daten nicht gezeigt) deutlich, dass einer der operierenden Toleranzmechanismen die Deletion OVA-spezifischer T-Zellen in der Peripherie ist. Dabei fiel die Deletion in der OT-1-T-Zellpopulation stärker aus als in der CD8-T-Zellpopulation. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde im Vergleich zu



Kontrolltieren in OVA-Chimären eine erhöhte Frequenz von einfach negativen ( $V\alpha 2^+V\beta 5.1^-$  bzw.  $V\alpha 2^-V\beta 5.1^+$ ) oder doppelt negativen ( $V\alpha 2^-V\beta 5.1^-$ ) CD8-T-Zellen gefunden (Abb. 23). Des Weiteren nahm die Frequenz von CD8-T-Zellen, welche andere  $V\alpha$ - und  $V\beta$ -Ketten als  $V\alpha 2$  und  $V\beta 5.1$  exprimierten, zu (Daten nicht gezeigt). Zum einen könnte die homeostatische Proliferation (Übersichtsartikel: Jameson 2002) nicht OVA-spezifischer CD8-T-Zellen hierfür verantwortlich sein. Zum anderen könnte diese Beobachtung auch auf ein erneutes Rearrangement der für den T-Zellrezeptor kodierenden Gene zurückzuführen sein. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Expression von RAG-1 und 2 (*recombination activating genes 1 and 2*), welche für die DNA-Rekombination der T-Zellrezeptorgene benötigt werden, nur in bestimmten Entwicklungsstadien der Thymozyten zu finden ist (Turka et al. 1991; Wilson et al. 1994). Für TCR-transgene CD4-T-Zellen wurde jedoch eine wiederkehrende Expression von RAG in der Peripherie beschrieben (McMahan and Fink 1998). Diese wurde mit einer erneuten DNA-Rekombination des T-Zellrezeptorlokus in Verbindung gebracht, als Folge einer kontinuierlichen peripheren Selektion von autoreaktiven CD4-T-Zellen (Ali et al. 2003; McMahan and Fink 1998). Es zeigte sich, dass diese Revision des T-Zellrezeptors (*TCR revision*), im Gegensatz zur Deletion autoreaktiver CD4-T-Zellen, radiosensitiv und abhängig von B-Zellen sowie der Expression von CD28, ICOS (*inducible costimulatory molecule*) und Fas ist (Ali et al. 2003). Ferner wurde gezeigt, dass nicht nur CD4-T-Zellen, welche kürzlich den Thymus verlassen haben, sondern auch reife T-Zellen durch ein erneutes Rearrangement des T-Zellrezeptorlokus toleriert werden können (Cooper et al. 2003). Während eine T-Zellrezeptor Revision auch für TCR-transgene CD8-T-Zellen beschrieben wurde, traf dies nur auf bestimmte TCR-transgene CD8-T-Zellen und nicht z.B. auf OT-1-T-Zellen zu (Serra et al. 2002). Daher ist wahrscheinlicher, dass es sich bei der beobachteten erhöhten Frequenz von  $V\alpha 2^-$  und  $V\beta 5.1^-$ -einfach oder -doppelt negativen CD8-T-Zellen in OVA-Chimären um einen homeostatischen Effekt handelt. Dies könnte überprüft werden, indem diese Zellen auf TRECs (*TCR rearrangement excision circles*) untersucht werden, welche stabile, aber nicht replizierende extrachromosomale zirkuläre DNA-Elemente sind und während der Rekombination des T-Zellrezeptors entstehen (Douek et al. 1998). TRECs werden somit auch in T-Zellen gefunden, welche kürzlich den Thymus verlassen haben (Kong et al. 1999). Daher müsste auf jeden Fall eine Thymektomie durchgeführt werden, um eine Kontamination durch dieser Zellen ausschließen zu können.

Die funktionelle Analyse im RIP-OVA<sup>lo</sup>-Modell der in den sOVA und TfrOVA-Chimären verbliebenen T-Zellen zeigte, dass diese keine oder eine schwächere Diabeteserkrankung auslösen (Abb. 26). Die fehlende bzw. stark beeinträchtigte zytotoxische Aktivität der

transferierten T-Zellen wurde auch an der verminderten Frequenz IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -produzierender OT-1-T-Zellen deutlich (Abb. 26). Jedoch waren die Tiere nicht immer vollständig vor einer Diabetesinduktion geschützt, was mehrere Ursachen haben kann:

1) zum einen ist das Diabetes-Modell sehr sensitiv, da schon  $1 \times 10^5$  OT-1-T-Zellen zu einer genauso starken Diabeteserkrankung führen wie die zehn- bis 50-fache Menge an transferierten T-Zellen (P. Kleindienst, unveröffentlichte Beobachtung). Daher reichen wohl auch weniger als  $1 \times 10^5$  OT-1-T-Zellen aus, um in diesem Modell Diabetes auszulösen.

2) da in den Chimären, welche auf OT-1 HSPC basieren, nahezu alle CD8-T-Zellen OVA erkennen und auch ständig neue OVA-spezifische T-Zellen entstehen, ist plausibel, dass das gesamte CD8-T-Zellrepertoire nicht zu jedem Zeitpunkt tolerant ist. Bereits wenige nicht tolerierte CD8-T-Zellen würden genügen, um eine Erkrankung auszulösen.

3) analog zur klonalen Deletion könnte auch die Anergisierung der OT-1-T-Zellen von der exprimierten Antigenmenge oder der Frequenz antigenexprimierender B-Zellen abhängen (Kurts et al. 1999; Morgan et al. 1999). Da die Analysen nicht auf der Verwendung von transgenen Mäusen mit stets unveränderten Variablen basieren, sondern auf der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems einer letal bestrahlten Maus durch Stamm- und Vorläuferzellen, welche mit Viruspräparationen transduziert wurden, besitzt dieser Ansatz eine nicht zu beeinflussende interne Variabilität. Die Tolerisierung eines transgenen CD8-T-Zellrepertoires (ca. 20 Millionen Zellen) und der Transfer von  $0,5 - 1 \times 10^6$  „autoreaktiven“ T-Zellen stellen unphysiologische Bedingungen dar, da die Anzahl an Effektorzellen die natürlicherweise vorkommende ( $< 1$  pro 100.000 Zellen; Tse et al. 1980) um ein Vielfaches übersteigt. Die Experimente zur Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires beweisen jedoch, dass eine vollständige und effektive Tolerisierung einer physiologisch vorkommenden Anzahl OVA-spezifischer T-Zellen möglich ist (Abb. 20).

Die Daten der *In-Vitro*-Stimulation der OT-1-T-Zellen zeigten, dass die proliferative Kapazität, die Expression von CD5 (negative Regulation des T-Zellrezeptorsignals) und die Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD62L, CD25 und CD69 nicht mit der Anergisierung der OT-1-T-Zellen aus sOVA-Chimären assoziiert war (Abb. 24). Die Proliferation und die Entwicklung von Effektorfunktionen stellen bei der Differenzierung von T-Zellen unabhängige Ereignisse dar, d.h. die T-Zellproliferation kann sowohl mit Toleranz als auch Immunität assoziiert sein (Hernandez et al. 2002; Huang and Yang 2004; Kreuwel et al. 2002; Liu et al. 2002).

In OT-1-Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund entwickeln sich bevorzugt die TCR-transgenen CD8-T-Zellen. Es existieren ebenfalls CD4-T-Zellen, wenn auch im Vergleich zu nicht

transgenen Tieren in stark reduzierter Anzahl (Clarke et al. 2000). Folglich könnte im RIP-OVA<sup>lo</sup>-Modell die beobachtete funktionelle Beeinträchtigung der aus sOVA- und TfrOVA-Chimären stammenden OT-1-T-Zellen auf die Induktion von regulatorischen oder supprimierenden CD4-T-Zellen durch die kontinuierliche Präsenz des Antigens bedingt sein (Kuwana 2002; Mahnke et al. 2002). Daher wurde vor dem Transfer der OT-1-T-Zellen in RIP-OVA<sup>lo</sup>-Mäuse die CD4-T-Zellpopulation depletiert. Es wurde kein signifikanter Einfluss der CD4-Depletion auf die Diabeteshäufigkeit und die mittlere Glukosekonzentration im Urin (Daten nicht gezeigt) beobachtet. Die mittlere Glukosekonzentration fiel für die CD4-depletierte Gruppe tendenziell sogar geringer aus, was auf eine Helferfunktion und nicht eine supprimierende Aktivität der depletierten CD4-T-Zellen bei der Induktion einer CD8-T-zellvermittelten Immunität hinweist.

Neben den natürlich vorkommenden und induzierbaren regulatorischen CD4-T-Zellen wurden auch regulatorische CD8-T-Zellen beschrieben, welche in CD8<sup>+</sup>Qa-1<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> unterschieden werden können. CD8<sup>+</sup>Qa-1<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen werden während einer primären Antwort induziert und wirken im Rahmen der sekundären Antwort auf CD4-Zellen und B-Zellen supprimierend (Hu et al. 2004; Jiang et al. 2003; Jiang et al. 1992). Während diese Zellen auf dem Hintergrund eines polyklonalen TCR-Repertoires induziert werden konnten, traf dies für TCR-transgene OT-1-T-Zellen nicht zu (Hu et al. 2004). Offenbar muss der T-Zellrezeptor ein Selbst-Peptid im Komplex mit dem nicht klassischen MHC-I-Molekül Qa-1 erkennen. Daher kann eine Induktion von CD8<sup>+</sup>Qa-1<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen im OT-1-Modell ausgeschlossen werden. Im polyklonalen System wurde nicht untersucht, ob die Expression von OVA in B-Zellen in Abwesenheit von entzündlichen Signalen und einer primären Immunantwort bereits ausreichend ist, um CD8<sup>+</sup>Qa-1<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen zu induzieren. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da diese Zellen bisher nur in Zusammenhang mit einer produktiven primären Immunantwort nachgewiesen wurden (Hu et al. 2004; Jiang et al. 2003; Jiang et al. 1992). In einer anderen Studie konnten humane regulatorische CD8-T-Zellen durch CD40L-stimulierte allogene plasmazytoide Dendritische Zellen induziert werden (Gilliet and Liu 2002), welche die Proliferation naiver CD8-T-Zellen durch die Sekretion von IL-10 nach Restimulation mit dem ursprünglichen Antigen inhibierten. Es ist unwahrscheinlich, dass die anergen OT-1-T-Zellen in den OVA-exprimierenden Chimären diese regulatorischen T-Zellen widerspiegeln, da sie im Gegensatz zu diesen keinen proliferativen Block besaßen (Abb. 24). Allerdings sollte dies im polyklonalen System überprüft werden, insbesondere nachdem kürzlich eine Subpopulation plasmazytoider

Dendritischer Zellen identifiziert wurde, welche CD19 zu exprimieren scheint (Munn et al. 2004).

Humane CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatorische T-Zellen können über mehrfache Stimulation *in vitro* durch allogene (Liu et al. 1998) oder xenogene (Ciubotariu et al. 1998) antigenpräsentierende Zellen generiert werden. Ferner wurden diese Zellen auch durch eine Stimulation auf autologen antigenpräsentierenden Zellen induziert, welche mit nominalen Antigenen wie MHC-I oder Tetanus-Toxid (Jiang et al. 1998) beladen wurden. Diese Zellen sind MHC-I-restringiert und supprimieren CD4-T-Zellen. Ihre regulatorische Funktion scheinen sie durch die Induktion von regulatorischen Dendritischen Zellen auszuüben, welche anstatt kostimulatorischen Molekülen ILT3 and ILT4 exprimieren und so CD4-T-Zellen anergisieren (Chang et al. 2002). Ob diese regulatorischen Zellen auch im murinen System existieren, ist unklar.

In zukünftigen Experimenten soll im polyklonalen System überprüft werden, ob regulatorische CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen aufgrund der OVA-Expression in B-Zellen und der Kreuzpräsentation des Antigens durch Dendritische Zellen generiert werden. In TCR-transgenen DO11.10-Mäusen, deren CD4-T-Zellen OVA<sub>323-339</sub> im Kontext von MHC-II erkennen, konnten durch eine systemische Expression von OVA regulatorische CD4-T-Zellen induziert werden (Kawahata et al. 2002; Kawahata et al. 2002). Daher sollen zum polyklonalen System analoge Studien in diesem TCR-transgenen Modell durchgeführt werden.

### **6.3.2 Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion**

Anhand der aus Knochenmarkszellen von OVA-exprimierenden Chimären hergestellten DC-Vakzine (Abb. 27) konnte gezeigt werden, dass die Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen nicht auf eine unspezifische Expression des Antigens in Dendritischen Zellen zurückzuführen ist. Ältere Untersuchungen zeigten, dass eine Antigenpräsentation durch B-Zellen zu einer Tolerisierung von CD8-T-Zellen führen kann (Bennett et al. 1998; Epstein et al. 1995; Fuchs and Matzinger 1992; Qin et al. 1998). Analog zu Studien, welche eine tolerogene Wirkung von B-Zellen auf CD4-T-Zellen belegen (El-Amine et al. 2000; Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995), konnten diese experimentellen Ansätze jedoch nicht klären, ob der damals in seiner Bedeutung für die Immunität und Toleranz nicht entsprechend beachtete Mechanismus der Kreuzpräsentation involviert ist. Der *In-Vitro*-Kreuzpräsentationstest (Abb. 28) zeigte, dass OVA-exprimierende B-Zellen MHC-I:Peptid-Komplexe generieren können,

welche von OVA-spezifischen T-Zellen erkannt werden. Weiterhin wurde deutlich, dass Dendritische Zellen das von B-Zellen hergestellte Ovalbumin aufnehmen, auf MHC-I kreuzpräsentieren und daher sehr wahrscheinlich an der Tolerisierung von CD8-T-Zellen beteiligt sind. In Übereinstimmung mit der gängigen Hypothese (Steinman and Cohn 1973), dass Dendritische Zellen effizientere antigenpräsentierende Zellen als B-Zellen sind, zeigten diese, im Vergleich zu den nicht über CD40 stimulierten B-Zellen, eine stärkere T-zellstimulatorische Kapazität. In Einklang mit den *In-Vitro*-Daten der Kreuzpräsentation konnte auch in  $\mu$ MT-Chimären Toleranz induziert werden (Abb. 29). In diesen Mäusen ist die B-Zellentwicklung auf dem Stadium der Prä-B-Zellen blockiert, d.h. dass diese Zellen kontinuierlich produziert werden, jedoch sterben, da ihre weitere Entwicklung aufgrund eines fehlenden Signals vom Prä-B-Zellrezeptor nicht möglich ist. Im Vergleich zu Kontroll-Tieren weisen  $\mu$ MT-Mäuse einen doppelt so hohen Prozentsatz an Prä-B-Zellen auf (Rolink et al. 1994). Da der CD19-Promotor bereits in diesem Entwicklungsstadium aktiv ist, besitzen OVA- $\mu$ MT-Chimären im Knochenmark Prä-B-Zellen, welche Ovalbumin exprimieren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Dendritische Zellen apoptotisches Material dieser Zellpopulation aufnehmen, kreuzpräsentieren und so OVA-spezifische CD8-T-Zellen tolerisieren können. Ob diese Tolerisierung im Knochenmark direkt, oder erst in der Milz stattfindet, ist unklar. Neben einer losen Verteilung der Lymphozyten im Stroma und Parenchym des Knochenmarks, konzentrieren sich diese auch in lymphoiden Follikeln, welche sich um die Blutgefäße herum ausbilden. Die Frequenz dieser Strukturen nimmt während einer Infektion, Entzündung oder Autoimmunkrankheit zu (Bain 2001; Custer 1973). Es wurde gezeigt, dass naive antigenspezifische T-Zellen im Knochenmark aktiviert werden und zu Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren können (Feurerer et al. 2003; Feuerer et al. 2004; Hommel and Kyewski 2003; Schirmacher et al. 2003). Somit stellen nicht nur die Milz und Lymphknoten, sondern auch das Knochenmark, eine Mikroumgebung dar, welche eine T-Zellaktivierung ermöglicht. In Abwesenheit von entzündlichen Signalen sollte folglich auch eine Toleranzinduktion in diesem hämatopoetischen Organ möglich sein.

Zahlreiche Studien belegen die tolerogene Wirkung von kreuzpräsentierenden Dendritischen Zellen in Abwesenheit eines kostimulatorischen oder entzündlichen Signals (Bonifaz et al. 2002; Hernandez et al. 2001; Hugues et al. 2002; Kurts et al. 1997; Liu et al. 2002). Die in  $\mu$ MT-Mäusen durchgeführten Experimente unterstützen die Hypothese, dass in dem hier präsentierten Ansatz die Kreuzpräsentation von OVA durch Dendritische Zellen an der Tolerisierung von CD8-T-Zellen beteiligt bzw. sogar der dafür allein verantwortliche Mechanismus sein könnte. Kürzlich wurde eine Subpopulation plasmazytoider Dendritischer

Zellen beschrieben, welche CD19 exprimieren (Munn et al. 2004). Dies bedeutet, dass aufgrund der CD19-spezifischen Regulation des retroviralen Vektors, plasmazytoide Dendritische Zellen möglicherweise Ovalbumin exprimieren. Diese Zellen sind an der Regulation von Immunität und Toleranz beteiligt und stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität dar (Übersichtsartikel: Colonna et al. 2004). Plasmazytoide Dendritische Zellen sind in allen lymphoiden Geweben und im Blut zu finden. Frisch isolierte humane und murine plasmazytoide Dendritische Zellen sind schlechte Stimulatoren einer T-Zellproliferation, da sie im Vergleich zu den klassischen Dendritischen Zellen Antigen ineffizienter aufnehmen und im Kontext von MHC-Molekülen präsentieren (Grouard et al. 1997). Ferner exprimieren sie weniger MHC-II und kostimulatorische Moleküle (Asselin-Paturel et al. 2001; Grouard et al. 1997). Sowohl unstimulierte humane als auch murine plasmazytoide Dendritische Zellen können CD4-T-Zellen anergisieren, welche wiederum selbst immunregulatorische Funktion annehmen und eine antigenspezifische T-Zellproliferation inhibieren (Boonstra et al. 2003; Martin et al. 2002). Ferner kann in plasmazytoiden Dendritischen Zellen die Produktion der Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) induziert werden, welche eine starke inhibitorische Wirkung auf die T-Zellproliferation ausübt (Fallarino et al. 2004). Aufgrund ihrer beschriebenen tolerogenen Eigenschaften muss überprüft werden, ob Ovalbumin-exprimierende, CD19-positive plasmazytoide Dendritische Zellen existieren und inwiefern diese an der Tolerisierung von CD8- und auch CD4-T-Zellen beteiligt sein könnten.

Ein weiterer ungeklärter Punkt ist, von welcher B-Zellpopulation die Dendritischen Zellen das Antigen aufnehmen. Im Knochenmark gehen  $35 \times 10^6$  große Prä-B-Zellen pro Tag in Mitose. Aufgrund eines nicht funktionellen oder autoreaktiven B-Zellrezeptors verlassen weniger als die Hälfte davon das primäre hämatopoetische Organ als unreife B-Zellen und wandern in die Milz aus (Rolink and Melchers 1996). Der Großteil dieser Zellen stirbt dort innerhalb der ersten drei bis vier Tage. Lediglich 5 - 10% werden in den langlebigen B-Zellpool mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von Wochen bis Monaten selektiert (Rolink and Melchers 1996). Dies bedeutet, dass sehr viele B-Zellen, auch OVA-exprimierende B-Zellen, tagtäglich im Knochenmark und der Milz sterben. Daher ist anzunehmen, dass von reifen B-Zellen und deren Vorläufern hergestelltes Ovalbumin in Form von apoptotischem Material von Dendritischen Zellen aufgenommen werden kann. Wie zelluläre Antigene in den Kreuzpräsentationsweg gelangen, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Neben der Phagozytose (Ackerman et al. 2003; Guermonprez et al. 2003), könnte die Aufnahme von Exosomen (Wolfers et al. 2001; Zitvogel et al. 1998) und Hitzeschockproteinen (Srivastava

2002), sowie das „Abknabbern“ (*nibbling*) des Antigens von lebenden Zellen (Harshyne et al. 2001; Harshyne et al. 2003) eine Rolle spielen. Dem apoptotischen Material (Albert et al. 1998; Arrode et al. 2000; Ferguson et al. 2002) als Antigenquelle für die Kreuzpräsentation wird hierbei die größte Bedeutung beigemessen. Welche Subpopulation der Dendritischen Zellen OVA kreuzpräsentiert, wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um die CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Dendritischen Zellen handelt, da diese bevorzugt apoptotisches Material aufnehmen (Iyoda et al. 2002; Schulz and Reis e Sousa 2002; Valdez et al. 2002). Es wurde gezeigt, dass CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Dendritische Zellen konstitutiv Antigen kreuzpräsentieren und so zytotoxische T-Zellen aktivieren können (den Haan et al. 2000). In CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Zellen scheint dieser Mechanismus aktivierungsabhängig zu sein (den Haan and Bevan 2002; Regnault et al. 1999). Die definitive Identität der tolerogenen Dendritischen Zelle ist allerdings noch umstritten. CD8<sup>+</sup> Dendritische Zellen scheinen sowohl in der Kreuzimmunität (*cross-priming*) als auch Kreuztoleranz (*cross-tolerance*) gegen zelluläres Antigen involviert zu sein (Übersichtsartikel: Heath et al. 2004). Ob dafür zwei unterschiedliche Zelltypen verantwortlich sind, oder ob dieselbe Dendritische Zelle solange Toleranz induziert bis sie einem entzündlichen Signal ausgesetzt wird, ist noch nicht abschließend geklärt (Bonifaz, Bonnyay et al. 2002; Hawiger, Inaba et al. 2001; Kurts, Kosaka et al. 1997; Menges, Rossner et al. 2002; Probst, Lagnel et al. 2003 und Übersichtsartikel: Steinman et al. 2003).

Sowohl membranständiges als auch lösliches Antigen hat in Dendritischen Zellen Zugang zum Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Ackerman et al. 2005). Dennoch wird membranständiges Ovalbumin wesentlich effizienter kreuzpräsentiert als lösliches (Li et al. 2001), da für die Induktion einer auf der Kreuzpräsentation basierenden Immunantwort eine wesentlich höhere Dosis des löslichen Antigens benötigt wird. Obwohl beide Formen des Antigens im ER nachgewiesen werden konnten, liegen zwei unterschiedliche Aufnahmemechanismen und Aufnahmekompartimente zugrunde: Phagosomen und Pinosomen. Die Ursache der unterschiedlichen Effizienz mit welcher lösliche und membranassoziierte Antigene kreuzpräsentiert werden, liegt wahrscheinlich in den verschiedenen zellulären Wegen begründet, welche den Transport des Proteins von den ungleichen Kompartimenten ins ER vermitteln. Alternativ könnten diese Beobachtungen durch eine sehr schnelle Inaktivierung des Proteins durch Serumproteasen oder eine Aufnahme, jedoch keine Kreuzpräsentation, durch andere Zellen bedingt sein. Dies würde auch erklären, warum im Serum von sOVA-Chimären kein lösliches Antigen nachweisbar war. Ferner wurde weder im polyklonalen noch im TCR-transgenen Modell ein funktioneller

Unterschied bzgl. der in B-Zellen exprimierten Form des Antigens (sOVA gegenüber TfrOVA) nachgewiesen. Milz, Lymphknoten und Knochenmark stellen eine Mikroumgebung dar, welche die intensive Interaktion von Dendritischen Zellen mit B-Zellen und T-Zellen ermöglicht und fördert. Es erscheint daher plausibel, dass die Kreuzpräsentation des von B-Zellen hergestellten löslichen Antigens wesentlich effizienter als die intravenöse Injektion von Ovalbumin (Li et al. 2001) sein könnte und daher kein funktioneller Unterschied zwischen den unterschiedlichen Darreichungsformen von OVA beobachtet wurde. Möglich ist auch, dass die Frequenz transgenexprimierender B-Zellen so hoch ist, dass eine genügend hohe Antigenmenge vorliegt, um trotz einer weniger effizienten Kreuzpräsentation des löslichen Ovalbumins Toleranz zu induzieren. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass die Effizienz mit welcher Proteine kreuzpräsentiert werden von Antigen zu Antigen variiert. Proteine besitzen je nach ihrer Funktion und Lokalisation in den zellulären Kompartimenten unterschiedliche Signalsequenzen. Diese bestimmen nicht nur den anfänglichen ersten Transport vom ER in das Kompartiment, in welchem das Protein seine Funktion ausübt, sondern sehr wahrscheinlich auch im Zuge der Kreuzpräsentation deren Transportweg zurück ins ER. Ferner scheint sich die Effizienz der Kreuzpräsentation zu unterscheiden, mit welcher unterschiedliche Epitope eines Proteins präsentiert werden. Epitope, welche sich z.B. in der Signalsequenz eines Proteins befinden, werden effizient über den endogenen, aber nicht über den exogenen Weg auf MHC-I präsentiert (Wolkers et al. 2004).

### ***Direkte Tolerisierung von CD8-T-Zellen durch B-Zellen***

Ob B-Zellen eine direkte tolerogene Wirkung auf CD8-T-Zellen ausüben, oder ob die Toleranzinduktion maßgeblich durch die Kreuzpräsentation des Antigens durch Dendritische Zellen erreicht wird, konnte in dieser Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden. Diese Frage sollte in einem experimentellen Ansatz beantwortet werden können, in welchem nur B-Zellen das Antigen präsentieren bzw. MHC-I-Moleküle besitzen. Hierfür könnte ein B-zellspezifischer Vektor in Kombination mit  $\beta 2m$  als Transgen zur Transduktion von  $\beta 2m$ -defizienten HSPC verwendet werden. Obwohl  $\beta 2m$ -defiziente Mäuse keine MHC-I-Moleküle exprimieren, konnte eine Expression der schweren Kette des MHC-I-Moleküls ohne  $\beta 2m$  an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Bix and Raulet 1992; Glas et al. 1992). In diesen Mäusen existiert eine im Vergleich zu Wildtypmäusen sehr kleine Population an CD8-T-Zellen, welche auf der schweren Kette des MHC-I-Moleküls positiv und negativ selektioniert wurde, jedoch  $\beta 2m$ -positive Zellen erkennt und abstößt (Cannarile et al. 2004). Wenn B-



Zellen ausreichen, um CD8-T-Zellen zu tolerisieren, dürften in Chimären, welche  $\beta 2m$  nur in B-Zellen exprimieren, keine  $\beta 2m$ -positiven Zellen abgestoßen werden. Die Aussagekraft dieses Modells ist jedoch nicht eindeutig, da gezeigt wurde, dass das heterodimere MHC-I-Molekül dissoziieren (Rock et al. 1991) und  $\beta 2m$  wieder mit der schweren Kette assoziieren kann (Rock et al. 1991; Rock et al. 1990). Daher besteht in diesen Chimären die Gefahr, dass genügend  $\beta 2m$  im Serum vorhanden ist, um MHC-I-Moleküle auch auf anderen Zellen als B-Zellen zu bilden. Daher sollen zur Klärung der Frage, ob B-Zellen direkt an der Tolerisierung von CD8-T-Zellen beteiligt sind, zwei weitere Mausmodelle herangezogen werden, in welchen die Kreuzpräsentation des Antigens durch Dendritische Zellen stark eingeschränkt ist (Kerksiek et al. 2005) bzw. Dendritische Zellen durch Gabe von Diphtheria-Toxin depletiert werden können (Jung et al. 2002) können. Analog zu den Chimären mit einer B-zellspezifischen Expression von  $\beta 2m$ , ist die Aussagekraft dieser Modelle nicht eindeutig. Im ersten ist die Kreuzpräsentation nicht völlig inhibiert, sondern nur stark eingeschränkt. Im letzten werden nicht alle CD11c-positiven Dendritischen Zellen eliminiert, sondern nur jene, die eine hohe Expression von CD11c aufweisen. Trotz der limitierten Aussagekraft der einzelnen genannten Mausmodelle, stellen diese die bestmögliche Annäherung an die Beantwortung der Frage, ob B-Zellen einen direkten Einfluss auf die Tolerisierung von CD8-T-Zellen *in vivo* haben.

### **6.3.3 Einfluss einer selektiven Antigenexpression in B-Zellen auf die B-Zellantwort**

Anhand der Immunisierung von sOVA-Chimären mit einem irrelevanten Antigen (KLH) wurde deutlich, dass sOVA-Chimären eine in Qualität und Quantität zu Kontroll-Chimären vergleichbare Antikörperantwort generieren können (Abb. 33). Die Immunisierung mit Ovalbumin zeigte, dass die selektive Expression von sOVA in B-Zellen zu keiner Toleranzinduktion in diesen führt. Sowohl die Bildung von OVA-spezifischen IgM- als auch IgG<sub>1</sub>-Antikörpern konnte induziert werden. In einem transgenen Mausmodell, in welchem lösliches Lysozym aus dem Hühnerei (*hen egg lysozym*, HEL) und ein hoch affiner anti-HEL Antikörper koexprimiert sind, werden autoreaktive B-Zellen nicht deletiert. Diese B-Zellen produzieren jedoch keine HEL-spezifischen Antikörper mehr und weisen eine stark reduzierte Expression des IgM-Moleküls an der Zelloberfläche auf (Goodnow et al. 1988). Jüngere Studien zeigten, dass die autoreaktiven B-Zellen in der Peripherie anergisch sind, nicht in die B-Zellfollikel einwandern können und durch einen Fas-unabhängigen Mechanismus sterben

(Ekland et al. 2004). Allerdings schützt eine baldige T-Zellhilfe nach dem initialen Antigenkontakt die B-Zelle vor der Anergisierung (Cook et al. 1998). In dieser Arbeit konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die fehlende Toleranz im B-Zellrepertoire auf eine fehlende Toleranz OVA-spezifischer CD4-T-Zellen zurückzuführen ist. OT-2-T-Zellen erkennen das im Kontext von MHC-II präsentierte Peptid OVA<sub>323-339</sub> aus dem Hühnerei-Albumin. Ein *In-Vitro*-Kreuzpräsentationstest wie in Abb. 28 gezeigt, wurde auch für TCR-transgene OT-2-T-Zellen durchgeführt, konnte allerdings keine Stimulation der T-Zellen durch Dendritische Zellen oder B-Zellen aus sOVA-Chimären nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass nicht genügend OVA<sub>323-339</sub> im Kontext von MHC-II auf die Zelloberfläche von Dendritischen Zellen und B-Zellen gelangt. Sehr wahrscheinlich waren daher die CD4-T-Zellen in den mit Ovalbumin immunisierten sOVA-Chimären nicht tolerisiert. Allerdings könnte die fehlende B-Zelltoleranz auch auf eine zu niedrige Serumkonzentration von Ovalbumin zurückgehen, da deren Induktion von der Menge des löslichen Antigens im Serum abzuhängen scheint. Während in CD4-T-Zellen unabhängig von der Serumkonzentration des Antigens Toleranz induziert werden konnte, war dies in B-Zellen bei weniger als 1,5 ng HEL/ml Serum nicht mehr möglich (Adelstein et al. 1991). Für eine zu geringe OVA-Konzentration als Ursache für die fehlende B-Zelltoleranz spricht auch, dass dieses im Serum durch einen ELISA, bei einer Detektionsgrenze von  $\geq 1$  und  $\leq 10$  ng/ml OVA, nicht nachweisbar war. Interessanterweise konnte in Mäusen, welche ubiquitär OVA im Nukleus und Zytoplasma exprimierten, dieses ebenfalls nicht im Serum nachgewiesen werden (Kawahata et al. 2002). In KLH-immunisierten, sOVA-exprimierenden Chimären wurden keine OVA-spezifischen Antikörper gemessen. Dies lässt vermuten, dass nicht genügend lösliches Ovalbumin verfügbar ist, um in Gegenwart von entzündlichen Signalen zu einer Aktivierung von OVA-spezifischen B-Zellen zu führen. Möglicherweise wird Ovalbumin sehr schnell durch Serumproteasen inaktiviert, was wiederum in Einklang mit der beobachteten Abhängigkeit der Toleranzinduktion in B-Zellen von der Antigenkonzentration im Serum steht. Die Verwendung von membranständigem Ovalbumin kann hier jedoch keinen Aufschluss geben, da gezeigt wurde, dass sich die Toleranzinduktion in B-Zellen mit membranständigem HEL anders als mit löslichem verhält. Membranständiges HEL stellt einen stärkeren Stimulus dar und führt bereits im Knochenmark zu einer Deletion unreifer B-Zellen. Eine andere Studie zeigte, dass autoreaktive B-Zellen gegen ihr membranständiges Antigen im Knochenmark hauptsächlich durch das Editieren des Rezeptors tolerisiert werden (Halverson et al. 2004). Erst wenn keine weitere Umlagerungen der B-Zellrezeptorgene mehr möglich sind, wird die autoreaktive B-Zelle deletiert. Daher soll in weiteren Experimenten

analysiert werden, ob die Form des in B-Zellen exprimierten Antigens und eine CD4-T-Zellhilfe Einfluss auf die Toleranzinduktion in B-Zellen hat. In diesem Zusammenhang sollen OVA-exprimierende Chimären auf Basis eines CD4-TCR-transgenen Mausstamm wie OT-2 oder DO11.10 generiert und untersucht werden.

## 6.4 Therapeutische Betrachtungen

Autoimmunkrankheiten sind chronische Krankheiten und bedürfen einer ständigen Medikamenteneinnahme (Tarnier and Fathman 2002). Die einzige Therapieform stellt bis heute eine generelle Immunsuppression dar. Die Gabe von TNF- $\alpha$ -blockierenden Antikörpern oder löslichen TNF-Rezeptoren zeigte deutliche therapeutische Effekte bei der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis, dennoch sprechen aus ungeklärten Gründen nur 50% der Patienten auf diese Behandlung an (Feldmann and Maini 2003). Ferner setzt die Blockade von proinflammatorischen Zytokinen die Patienten einem erhöhten Risiko für bestimmte Infektion wie Tuberkulose aus (Feldmann and Maini 2003; Mayordomo et al. 2002; Nunez Martinez et al. 2001). Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten ein höheres Risiko Lymphome oder Blasenkrebs zu entwickeln, wenn sie mit bestimmten immunsupprimierenden Medikamenten wie Cyclosporin behandelt wurden (Beauparlant et al. 1999; Kamel et al. 1995). Die Behandlung von MS-Patienten mit einem monoklonalen anti-CD52 Antikörper führte zu einer Verbesserung des Krankheitsverlaufs, aber ein Drittel der Patienten entwickelte einen autoimmunem Hyperthyroidismus (Coles et al. 1999). Daher werden Strategien benötigt, die eine antigenspezifische und langlebige Toleranz induzieren können. Für Autoimmunkrankheiten wie Typ-I-Diabetes und Multiple Sklerose, an deren Pathogenese CD4- und CD8-T-Zellen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Liblau et al. 2002), konnten auch die Antigene identifiziert werden: Insulin, IA-2, Glutensäure-Decarboxylase und Hitzeschockprotein 60 bei Typ-I-Diabetes, verschiedene Myelinproteine und Myelinlipide bei Multipler Sklerose (Übersichtsartikel: Steinman 2004). Einige Studien zeigten bereits, dass antigenspezifische Toleranz in T-Zellen induziert werden kann, indem das Antigen mittels retroviraler Vektoren in murine Knochenmarkszellen eingeschleust wird (Agarwal et al. 2000; Ally et al. 1995; Bagley et al. 2002; Kang and Iacomini 2002). Diese Ansätze verfolgten jedoch keine zellspezifische Expression des Antigens in definierten Zelltypen, sondern beruhten auf einer mehr oder weniger ubiquitären Expression. Aus theoretisch offensichtlichen und real gewordenen Bedenken (Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Li et al. 2004), sollte die Expression eines Transgens im Rahmen einer auf

retroviralen Vektoren basierenden therapeutischen Behandlung so weit wie möglich auf den hierfür funktionell relevanten Zelltyp beschränkt werden, um das Risiko ernster Nebenwirkungen zu minimieren.

Eine *Ex-Vivo*-Transduktion und Reinfusion autologer reifer und langlebiger B-Zellen wäre einem auf Stammzellen basierenden Ansatz aufgrund der damit verbundenen karzinogenen und mutagenen Risiken vorzuziehen. Dies setzt jedoch voraus, dass die Aufnahme und Kreuzpräsentation des von reifen und langlebigen B-Zellen hergestellten Antigens für eine Tolerisierung ausreichend ist. Ferner ist unklar, ob der Tolerisierung eines polyklonalen CD8-T-Zellrepertoires eine vollständige Eliminierung „autoreaktiver“ T-Zellen zugrunde liegt oder ob die im OT-1-TCR-transgenen System beobachtete Deletion und Anergisierung als kooperative Mechanismen anzusehen sind. Diese Unterscheidung konnte in dieser Arbeit nicht getroffen werden, da die Vorläuferfrequenz OVA-spezifischer polyklonaler CD8-T-Zellen in nicht immunisierten Mäusen unter der Detektionsgrenze von MHC-I:Peptid-Tetrameren liegt. Die Aufrechterhaltung des toleranten Status anergisierter T-Zellen scheint von der Persistenz des Antigens abzuhängen (Pape et al. 1998; Redmond et al. 2003; Rocha et al. 1995; Rocha and von Boehmer 1991), so dass zu bestimmen wäre in welchen Zeitabständen der Transfer autoantigenexprimierender B-Zellen wiederholt werden müsste. Ferner muss dieser Aspekt im Hinblick auf die andauernde Aktivität des Thymus bedacht werden, obgleich diese mit zunehmendem Alter langsam abnimmt (Isaacs and Thiel 2004). Würde das Antigen dagegen durch Dendritische Zellen vornehmlich von Prä-B-Zellen oder unreifen B-Zellen aufgenommen, welche während der B-Zellentwicklung im Knochenmark und der Milz in großer Anzahl sterben, so wäre ein auf Stammzellen basierender Therapieansatz wirkungsvoller. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tolerisierung von CD8-T-Zellen in  $\mu$ MT-Mäusen möglich ist. Daraus geht hervor, dass eine Antigenexpression auf Ebene der Prä-B-Zellen für die periphere Toleranzinduktion in CD8-T-Zellen bereits ausreicht. Dies schließt jedoch nicht aus, dass auch andere Entwicklungsstufen der B-Zellen eine Rolle als Antigenquelle oder direkt als antigenpräsentierende und tolerisierende Zellen spielen.

Seit 1995 werden Studien unternommen, in denen Patienten mit einer Autoimmunkrankheit autologe oder allogene Stammzellen unter myeloablativen Bedingungen transplantiert werden. Es wird untersucht, ob sich durch die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems eine immunologische Toleranz neu etablieren lässt (Fassas and Nash 2004). Ein Problem scheint jedoch zu sein, dass die Autoimmunkrankheit aufgrund autoreaktiver T-Zellen im Transplantat oder die Bestrahlung überlebender T-Zellen wieder auftreten kann (van Bekkum

1998; van Bekkum 2004). Im Vergleich zu naiven Zellen sind Gedächtniszellen wesentlich radioresistenter. In dieser konnte Arbeit gezeigt werden, dass auch Gedächtniszellen tolerisiert werden können (Abb. 31). Die Gedächtniszellen proliferierten, akkumulierten jedoch in den meisten Tieren nicht. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, welche zeigten, dass naive T-Zellen und Gedächtniszellen im Rahmen der Toleranzinduktion eine transiente Proliferations- und Effektorphase durchlaufen, was mit dem Begriff „*abortive proliferation*“ belegt wurde (Curtsinger et al. 2003; Hernandez et al. 2002; Huang and Yang 2004; Kreuwel et al. 2002; Kurts et al. 1999; Liu et al. 2002; Morgan et al. 1999). Ungeachtet dessen, ob die Gedächtniszellen akkumulierten oder zum Großteil deletiert wurden, produzierten diese kein TNF- $\alpha$  und die meisten auch kein IFN- $\gamma$  (Abb. 31). Folglich waren der Tolerisierung naiver CD8-T-Zellen analoge Mechanismen deutlich: die klonale Deletion und Anergisierung. In einigen Tieren wurde keine Deletion, sondern eine Akkumulation der transferierten Gedächtniszellen in sOVA-exprimierenden Chimären beobachtet, was möglicherweise auf eine höhere Antigenmenge in diesen Tieren zurückzuführen sein könnte. Kürzlich zeigte eine Studie, dass CD8-T-Zellen in Gegenwart einer hohen Antigenmenge anergisiert werden, während eine niedrige Antigenmenge zu ihrer Deletion führt (Redmond et al. 2005). Ferner scheint die zur Tolerisierung von autoreaktiven T-Zellen benötigte Zeit von der exprimierten Antigenmenge abzuhängen, wie ein Vergleich zwischen heterozygoten und homozygoten Mäusen zeigte, welche auf pankreatischen Zellen Hämagglutinin (HA) exprimieren (van Bekkum 1998; van Bekkum 2004). In homozygoten Tieren konnten  $10^4$  autoreaktive naive T-Zellen innerhalb von zehn Tagen tolerisiert werden, während dies in heterozygoten 120 - 220 Tage erforderte. In dieser Arbeit konnten in den meisten Tieren 90% der  $2 \times 10^6$  transferierten Gedächtniszellen innerhalb von 14 Tagen deletiert werden (Abb. 31). Die schnellere Kinetik könnte im Phänotyp der transferierten T-Zellen (Gedächtniszellen gegenüber naiven T-Zellen) begründet sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass in dem hier gezeigten System die Anzahl antigenexprimierender Zellen höher ist (30 - 50% aller B-Zellen gegenüber den Insulin produzierenden Pankreas-Zellen).

Es konnte gezeigt werden, dass die Tolerisierung von polyklonalen CD8-T-Zellen auch unter nicht myeloablativen Bedingungen möglich ist. Diese Art der Konditionierung bedingt, dass nicht alle T-Zellen deletiert werden. Vier Tage nach Bestrahlung mit 600 rad sind noch etwa 5% der T-Zellen nachweisbar (A. Gruber, unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse zusammen mit den Tolerisierungsdaten von Gedächtniszellen zeigen, dass T-Zellen nicht nur während der Rekonstitutionsphase nach einer Bestrahlung bzw. T-Zellen, welche kürzlich den Thymus verlassen haben, tolerisierbar sind. Es wurde vorgeschlagen, dass letztere funktionell

noch nicht vollständig ausgereift (Boursalian et al. 2004) und in diesem Stadium möglicherweise sehr empfänglich für tolerogene Signale sind.

Autoantigenexprimierende B-Zellen könnten ein gutes Ziel für die Toleranzinduktion in CD4- und CD8-T-Zellen sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Antigenexpression in B-Zellen Toleranz in CD8-T-Zellen induzieren kann. Es konnte keine Präsentation von MHC-II:Peptid-Komplexen nachgewiesen werden, welche eine Tolerisierung von CD4-T-Zellen induzieren hätte können. Dies könnte auf die Form des verwendeten Antigens (sOVA) zurückzuführen sein; eine Frage, welche in zukünftigen Experimenten geklärt werden soll. Andere Studien zeigen, dass B-Zellen CD4-T-Zellen tolerisieren können (El-Amine et al. 2000; Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995). Allerdings wurde die Rolle der Dendritischen Zelle in diesem Prozess nicht untersucht, welche jedoch mit Sicherheit auch zur Toleranzinduktion in CD4-T-Zellen beiträgt (El-Amine et al. 2000; Eynon and Parker 1993; Saoudi et al. 1995). Daher erschiene es theoretisch sinnvoller Dendritische Zellen direkt zu modifizieren und nicht B-Zellen, welche möglicherweise nur als Antigenquelle fungieren. Die Möglichkeit eine Antigenexpression oder Antigenpräsentation auf Dendritische Zellen direkt zu restringieren, ist limitiert. Die Antigenaufnahme über einen vornehmlich auf Dendritischen Zellen exprimierten Rezeptor DEC-205, (Bonifaz et al. 2002; Liu et al. 2002) führt zu einer zeitlich limitierten Antigenpräsentation, die im Vergleich zu einer stabilen Antigenexpression wesentlich kürzer andauernde Effekte auslösen kann und daher nicht geeignet sein würde, um den anergen Status nicht deletierter, autoreaktiver T-Zellen aufrecht zu erhalten. Retrovirale Systeme für eine stabile Antigenexpression in Dendritischen Zellen existieren bisher noch nicht. Eine Möglichkeit wäre ein retroviraler Vektor mit dem CD11c-Promotor (Brocker et al. 1997). Allerdings stellen die zahlreichen Untergruppen der Dendritischen Zellen mit ihrer differentiellen Expression zahlreicher Marker, unter anderem auch CD11c, und die ungenauen Kenntnisse über die Identität der tolerogenen Dendritischen Zelle(n) ein Hindernis dar (Übersichtsartikel: Heath et al. 2004). Ferner ist eine *Ex-Vivo*-Transduktion und Reinfusion von Dendritischen Zellen technisch schwierig, da diese allein durch mechanische Reize zu reifen, immunstimulatorischen Zellen differenzieren können (Inaba et al. 1990; Schuler and Steinman 1985). Indem die Antigenexpression auf B-Zellen restringiert würde, nützte man möglicherweise den Mechanismus der Kreuzpräsentation aus, welcher einen sehr effektiven Mechanismus zur Tolerisierung von T-Zellen darzustellen scheint (Bonifaz et al. 2002; Hawiger et al. 2001; Kurts et al. 1997; Probst et al. 2003).

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Abonour, R., D. A. Williams, L. Einhorn, K. M. Hall, J. Chen, J. Coffman, et al. (2000). "Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells." Nat Med **6**(6): 652-8.
- Ackerman, A. L. and P. Cresswell (2004). "Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens." Nat Immunol **5**(7): 678-84.
- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12889-94.
- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2005). "Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells." Nat Immunol **6**(1): 107-13.
- Adelstein, S., H. Pritchard-Briscoe, T. A. Anderson, J. Crosbie, G. Gammon, R. H. Loblay, et al. (1991). "Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen." Science **251**(4998): 1223-5.
- Agarwal, R. K., Y. Kang, E. Zambidis, D. W. Scott, C. C. Chan and R. R. Caspi (2000). "Retroviral gene therapy with an immunoglobulin-antigen fusion construct protects from experimental autoimmune uveitis." J Clin Invest **106**(2): 245-52.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **188**(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature **392**(6671): 86-9.
- Alferink, J., A. Tafuri, D. Vestweber, R. Hallmann, G. J. Hammerling and B. Arnold (1998). "Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking." Science **282**(5392): 1338-41.
- Ali, M., M. Weinreich, S. Balcaitis, C. J. Cooper and P. J. Fink (2003). "Differential regulation of peripheral CD4+ T cell tolerance induced by deletion and TCR revision." J Immunol **171**(11): 6290-6.
- Ally, B. A., T. S. Hawley, K. J. McKall-Faienza, T. M. Kundig, S. U. Oehen, H. Pircher, et al. (1995). "Prevention of autoimmune disease by retroviral-mediated gene therapy." J Immunol **155**(11): 5404-8.
- Anderson, G., N. C. Moore, J. J. Owen and E. J. Jenkinson (1996). "Cellular interactions in thymocyte development." Annu Rev Immunol **14**: 73-99.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux and A. Bandeira (2001). "On the ontogeny and physiology of regulatory T cells." Immunol Rev **182**: 5-17.
- Arrode, G., C. Boccaccio, J. Lule, S. Allart, N. Moinard, J. P. Abastado, et al. (2000). "Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells." J Virol **74**(21): 10018-24.

- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." *J Exp Med* **184**(2): 387-96.
- Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel, et al. (1994). "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus." *Cell* **76**(4): 651-63.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* **2**(12): 1144-50.
- Avichezer, D., R. S. Grajewski, C. C. Chan, M. J. Mattapallil, P. B. Silver, J. A. Raber, et al. (2003). "An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance: major role for central selection mechanisms." *J Exp Med* **198**(11): 1665-76.
- Bagley, J., J. L. Bracy, C. Tian, E. S. Kang and J. Iacomini (2002). "Establishing immunological tolerance through the induction of molecular chimerism." *Front Biosci* **7**: d1331-7.
- Bain, B. (2001). *Bone Marrow Pathology*, Blackwell Science.
- Bansal-Pakala, P., A. G. Jember and M. Croft (2001). "Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance." *Nat Med* **7**(8): 907-12.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson and P. K. Srivastava (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-46.
- Baum, C., S. Hegewisch-Becker, H. G. Eckert, C. Stocking and W. Ostertag (1995). "Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells." *J Virol* **69**(12): 7541-7.
- Beauparlant, P., K. Papp and B. Haraoui (1999). "The incidence of cancer associated with the treatment of rheumatoid arthritis." *Semin Arthritis Rheum* **29**(3): 148-58.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach and D. L. Sacks (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity." *Nature* **420**(6915): 502-7.
- Bellone, M., G. Iezzi, P. Rovere, G. Galati, A. Ronchetti, M. P. Protti, et al. (1997). "Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes." *J Immunol* **159**(11): 5391-9.
- Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, et al. (2002). "The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens." *J Exp Med* **196**(8): 1099-104.
- Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton and A. Bendelac (2002). "A thymic precursor to the NK T cell lineage." *Science* **296**(5567): 553-5.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, T. Toy, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "B cells directly tolerize CD8(+) T cells." *J Exp Med* **188**(11): 1977-83.
- 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**(5): 1283-8.
- Bix, M. and D. Raulet (1992). "Functionally conformed free class I heavy chains exist on the surface of beta 2 microglobulin negative cells." *J Exp Med* **176**(3): 829-34.



- Blanas, E. and W. R. Heath (1999). "Oral administration of antigen can lead to the onset of autoimmune disease." Int Rev Immunol **18**(3): 217-28.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, R. M. Steinman, et al. (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." J Exp Med **196**(12): 1627-38.
- Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu, et al. (2003). "Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation." J Exp Med **197**(1): 101-9.
- Borgulya, P., H. Kishi, Y. Uematsu and H. von Boehmer (1992). "Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles." Cell **69**(3): 529-37.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso (2000). "Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion." Immunity **13**(6): 829-40.
- Boursalian, T. E., J. Golob, D. M. Soper, C. J. Cooper and P. J. Fink (2004). "Continued maturation of thymic emigrants in the periphery." Nat Immunol **5**(4): 418-25.
- Bousso, P., N. R. Bhakta, R. S. Lewis and E. Robey (2002). "Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy." Science **296**(5574): 1876-80.
- Boyd, R. L. and P. Hugo (1991). "Towards an integrated view of thymopoiesis." Immunol Today **12**(2): 71-9.
- Boynton, J. E., E. H. Harris, B. D. Burkhardt, P. M. Lamerson and N. W. Gillham (1987). "Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(8): 2391-5.
- Bradley, L. M., V. C. Asensio, L. K. Schioetz, J. Harbertson, T. Krahl, G. Patstone, et al. (1999). "Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes." J Immunol **162**(5): 2511-20.
- Brandle, D., C. Muller, T. Rulicke, H. Hengartner and H. Pircher (1992). "Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9529-33.
- Brocker, T., M. Riedinger and K. Karjalainen (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-50.
- Bruce, W. B., A. H. Christensen, T. Klein, M. Fromm and P. H. Quail (1989). "Photoregulation of a phytochrome gene promoter from oat transferred into rice by particle bombardment." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9692-6.
- Busch, D. H., I. M. Pilip, S. Vijn and E. G. Pamer (1998). "Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection." Immunity **8**(3): 353-62.
- Butz, E. A. and M. J. Bevan (1998). "Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection." Immunity **8**(2): 167-75.

- Callan, M. F., L. Tan, N. Annels, G. S. Ogg, J. D. Wilson, C. A. O'Callaghan, et al. (1998). "Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo." J Exp Med **187**(9): 1395-402.
- Cannarile, M. A., N. Decanis, J. P. van Meerwijk and T. Brocker (2004). "The role of dendritic cells in selection of classical and nonclassical CD8+ T cells in vivo." J Immunol **173**(8): 4799-805.
- Carroll, M. C. (2004). "The complement system in B cell regulation." Mol Immunol **41**(2-3): 141-6.
- Carsetti, R., G. Kohler and M. C. Lamers (1995). "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." J Exp Med **181**(6): 2129-40.
- Challita, P. M. and D. B. Kohn (1994). "Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2567-71.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chen, C., A. Rivera, N. Ron, J. P. Dougherty and Y. Ron (2001). "A gene therapy approach for treating T-cell-mediated autoimmune diseases." Blood **97**(4): 886-94.
- Chowdhury, M. G., K. Maeda, K. Yasutomo, Y. Maekawa, A. Furukawa, M. Azuma, et al. (1996). "Antigen-specific B cells are required for the secondary response of T cells but not for their priming." Eur J Immunol **26**(7): 1628-33.
- Ciubotariu, R., A. I. Colovai, G. Pennesi, Z. Liu, D. Smith, P. Berlocco, et al. (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28-regulatory T cells." J Immunol **161**(10): 5193-202.
- Clarke, S. R., M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (2000). "Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection." Immunol Cell Biol **78**(2): 110-7.
- Coffin JM, H. S., Varmus HE (1997). Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coles, A. J., M. Wing, S. Smith, F. Coraddu, S. Greer, C. Taylor, et al. (1999). "Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis." Lancet **354**(9191): 1691-5.
- Coles, R. M., S. N. Mueller, W. R. Heath, F. R. Carbone and A. G. Brooks (2002). "Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1." J Immunol **168**(2): 834-8.
- Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Constant, S. L. (1999). "B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo." J Immunol **162**(10): 5695-703.
- Cook, M. C., A. Basten and B. Fazekas de St Groth (1998). "Rescue of self-reactive B cells by provision of T cell help in vivo." Eur J Immunol **28**(8): 2549-58.
- Cooper, C. J., M. T. Orr, C. J. McMahan and P. J. Fink (2003). "T cell receptor revision does not solely target recent thymic emigrants." J Immunol **171**(1): 226-33.

- Crystal, R. G. (1995). "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success." Science **270**(5235): 404-10.
- Cui, Y., J. Golob, E. Kelleher, Z. Ye, D. Pardoll and L. Cheng (2002). "Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells." Blood **99**(2): 399-408.
- Cunningham, A. J. and K. J. Lafferty (1977). "A simple conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes." Scand J Immunol **6**(1-2): 1-6.
- Cupelli, L., S. A. Okenquist, A. Trubetsky and J. Lenz (1998). "The secondary structure of the R region of a murine leukemia virus is important for stimulation of long terminal repeat-driven gene expression." J Virol **72**(10): 7807-14.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-51.
- Custer, R. (1973). An Atlas of the Blood and Bone Marrow, W.B. Saunders Company, Toronto.
- De Bruijn, M. L., J. D. Nieland, T. N. Schumacher, H. L. Ploegh, W. M. Kast and C. J. Melief (1992). "Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses." Eur J Immunol **22**(11): 3013-20.
- Debrick, J. E., P. A. Campbell and U. D. Staerz (1991). "Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses." J Immunol **147**(9): 2846-51.
- Deenen, G. J., I. Van Balen and D. Opstelten (1990). "In rat B lymphocyte genesis sixty percent is lost from the bone marrow at the transition of nondividing pre-B cell to sIgM+ B lymphocyte, the stage of Ig light chain gene expression." Eur J Immunol **20**(3): 557-64.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, J. Q. He and G. Cheng (2003). "The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily." Cytokine Growth Factor Rev **14**(3-4): 193-209.
- den Haan, J. M. and M. J. Bevan (2002). "Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo." J Exp Med **196**(6): 817-27.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." J Exp Med **192**(12): 1685-96.
- Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski and L. Klein (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." Nat Immunol **2**(11): 1032-9.
- Diaz, R. M., T. Eisen, I. R. Hart and R. G. Vile (1998). "Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma." J Virol **72**(1): 789-95.
- Diebold, S. S., M. Cotten, N. Koch and M. Zenke (2001). "MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells." Gene Ther **8**(6): 487-93.
- Doherty, P. C. (1998). "The numbers game for virus-specific CD8+ T cells." Science **280**(5361): 227.
- Donello, J. E., J. E. Loeb and T. J. Hope (1998). "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element." J Virol **72**(6): 5085-92.

- Douek, D. C., R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, et al. (1998). "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature **396**(6712): 690-5.
- Ekland, E. H., R. Forster, M. Lipp and J. G. Cyster (2004). "Requirements for follicular exclusion and competitive elimination of autoantigen-binding B cells." J Immunol **172**(8): 4700-8.
- El-Amine, M., M. Melo, Y. Kang, H. Nguyen, J. Qian and D. W. Scott (2000). "Mechanisms of tolerance induction by a gene-transferred peptide-IgG fusion protein expressed in B lineage cells." J Immunol **165**(10): 5631-6.
- Epstein, M. M., F. Di Rosa, D. Jankovic, A. Sher and P. Matzinger (1995). "Successful T cell priming in B cell-deficient mice." J Exp Med **182**(4): 915-22.
- Erikson, J., M. Z. Radic, S. A. Camper, R. R. Hardy, C. Carmack and M. Weigert (1991). "Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice." Nature **349**(6307): 331-4.
- Essery, G., M. Feldmann and J. R. Lamb (1988). "Interleukin-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes." Immunology **64**(3): 413-7.
- Eynon, E. E. and D. C. Parker (1993). "Parameters of tolerance induction by antigen targeted to B lymphocytes." J Immunol **151**(6): 2958-64.
- Fallarino, F., C. Asselin-Paturel, C. Vacca, R. Bianchi, S. Gizzi, M. C. Fioretti, et al. (2004). "Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement." J Immunol **173**(6): 3748-54.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**(2): 541-8.
- Fassas, A. and R. Nash (2004). "Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Multiple sclerosis." Best Pract Res Clin Haematol **17**(2): 247-62.
- Fehervari, Z. and S. Sakaguchi (2004). "CD4+ Tregs and immune control." J Clin Invest **114**(9): 1209-17.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (2003). "Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases." Nat Med **9**(10): 1245-50.
- Ferguson, T. A., J. Herndon, B. Elzey, T. S. Griffith, S. Schoenberger and D. R. Green (2002). "Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8(+) T cells produce active immune unresponsiveness." J Immunol **168**(11): 5589-95.
- Feurerer, M., P. Beckhove, N. Garbi, Y. Mahnke, A. Limmer, M. Hommel, et al. (2003). "Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen." Nat Med **9**(9): 1151-7.
- Feurerer, M., P. Beckhove, Y. Mahnke, M. Hommel, B. Kyewski, A. Hamann, et al. (2004). "Bone marrow microenvironment facilitating dendritic cell: CD4 T cell interactions and maintenance of CD4 memory." Int J Oncol **25**(4): 867-76.
- Forster, I. and K. Rajewsky (1990). "The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4781-4.

- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." *J Exp Med* **192**(7): 1027-34.
- Fuchs, E. J. and P. Matzinger (1992). "B cells turn off virgin but not memory T cells." *Science* **258**(5085): 1156-9.
- Furger, A., J. Monks and N. J. Proudfoot (2001). "The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation." *J Virol* **75**(23): 11735-46.
- Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2004). "Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation." *J Exp Med* **200**(8): 1039-49.
- Ghia, P., E. ten Boekel, A. G. Rolink and F. Melchers (1998). "B-cell development: a comparison between mouse and man." *Immunol Today* **19**(10): 480-5.
- Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **195**(6): 695-704.
- Gisler, R., P. Akerblad and M. Sigvardsson (1999). "A human early B-cell factor-like protein participates in the regulation of the human CD19 promoter." *Mol Immunol* **36**(15-16): 1067-77.
- Glas, R., L. Franksson, C. Ohlen, P. Hoglund, B. Koller, H. G. Ljunggren, et al. (1992). "Major histocompatibility complex class I-specific and -restricted killing of beta 2-microglobulin-deficient cells by CD8+ cytotoxic T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(23): 11381-5.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud and J. F. Bach (1996). "Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse." *Eur J Immunol* **26**(12): 2989-98.
- Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, et al. (1988). "Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice." *Nature* **334**(6184): 676-82.
- Gotter, J., B. Brors, M. Hergenbahn and B. Kyewski (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." *J Exp Med* **199**(2): 155-66.
- Gourley, T. S., E. J. Wherry, D. Masopust and R. Ahmed (2004). "Generation and maintenance of immunological memory." *Semin Immunol* **16**(5): 323-33.
- Grande, A., B. Piovani, A. Aiuti, S. Ottolenghi, F. Mavilio and G. Ferrari (1999). "Transcriptional targeting of retroviral vectors to the erythroblastic progeny of transduced hematopoietic stem cells." *Blood* **93**(10): 3276-85.
- Gredmark, S. and C. Soderberg-Naucler (2003). "Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions." *J Virol* **77**(20): 10943-56.
- Grez, M., M. Zornig, J. Nowock and M. Ziegler (1991). "A single point mutation activates the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in embryonal stem cells." *J Virol* **65**(9): 4691-8.

- Gropp, M., P. Itsykson, O. Singer, T. Ben-Hur, E. Reinhartz, E. Galun, et al. (2003). "Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors." Mol Ther **7**(2): 281-7.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Guermontprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." Nature **425**(6956): 397-402.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, et al. (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." N Engl J Med **348**(3): 255-6.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Halverson, R., R. M. Torres and R. Pelandra (2004). "Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens." Nat Immunol **5**(6): 645-50.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hardy, R. R. (1992). "Variable gene usage, physiology and development of Ly-1+ (CD5+) B cells." Curr Opin Immunol **4**(2): 181-5.
- Hardy, R. R., C. E. Carmack, S. A. Shinton, J. D. Kemp and K. Hayakawa (1991). "Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow." J Exp Med **173**(5): 1213-25.
- Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, T. T. Lu, V. N. Ngo, A. Bidgol, G. Suzuki, et al. (2001). "A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements." J Exp Med **194**(1): 45-56.
- Harshyne, L. A., S. C. Watkins, A. Gambotto and S. M. Barratt-Boyes (2001). "Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL." J Immunol **166**(6): 3717-23.
- Harshyne, L. A., M. I. Zimmer, S. C. Watkins and S. M. Barratt-Boyes (2003). "A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells." J Immunol **170**(5): 2302-9.
- Hartley, S. B., J. Crosbie, R. Brink, A. B. Kantor, A. Basten and C. C. Goodnow (1991). "Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens." Nature **353**(6346): 765-9.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, et al. (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." J Exp Med **194**(6): 769-79.
- Hayakawa, K., R. R. Hardy and L. A. Herzenberg (1985). "Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells." J Exp Med **161**(6): 1554-68.
- Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, et al. (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." Immunol Rev **199**: 9-26.

- Heit, A., K. M. Huster, F. Schmitz, M. Schiemann, D. H. Busch and H. Wagner (2004). "CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells." *J Immunol* **172**(3): 1501-7.
- Hernandez, J., S. Aung, K. Marquardt and L. A. Sherman (2002). "Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens." *J Exp Med* **196**(3): 323-33.
- Hernandez, J., S. Aung, W. L. Redmond and L. A. Sherman (2001). "Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen." *J Exp Med* **194**(6): 707-17.
- Hildinger, M., K. L. Abel, W. Ostertag and C. Baum (1999). "Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use." *J Virol* **73**(5): 4083-9.
- Hofer, M., S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock and Y. A. Barde (1990). "Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain." *Embo J* **9**(8): 2459-64.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson and M. J. Bevan (1995). "Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8+ T cells." *Immunity* **3**(1): 79-86.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan and F. R. Carbone (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." *Cell* **76**(1): 17-27.
- Hollsberg, P., V. Batra, A. Dressel and D. A. Hafler (1996). "Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen." *J Immunol* **157**(12): 5269-76.
- Hommel, M. and B. Kyewski (2003). "Dynamic changes during the immune response in T cell-antigen-presenting cell clusters isolated from lymph nodes." *J Exp Med* **197**(3): 269-80.
- Howard, J. C., S. V. Hunt and J. L. Gowans (1972). "Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats." *J Exp Med* **135**(2): 200-19.
- Hu, D., K. Ikizawa, L. Lu, M. E. Sanchirico, M. L. Shinohara and H. Cantor (2004). "Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice." *Nat Immunol* **5**(5): 516-23.
- Huang, J. and T. J. Liang (1993). "A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products." *Mol Cell Biol* **13**(12): 7476-86.
- Huang, X. and Y. Yang (2004). "Transient gain of effector function by CD8+ T cells undergoing peripheral tolerance to high-dose self-antigen." *Eur J Immunol* **34**(5): 1351-60.
- Huang, Z. M., W. Q. Zang and T. S. Yen (1996). "Cellular proteins that bind to the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element." *Virology* **217**(2): 573-81.
- Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard and S. Amigorena (2004). "Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity." *Nat Immunol* **5**(12): 1235-42.
- Hugues, S., E. Mougneau, W. Ferlin, D. Jeske, P. Hofman, D. Homann, et al. (2002). "Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells." *Immunity* **16**(2): 169-81.

- Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley and R. M. Steinman (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." J Exp Med **172**(2): 631-40.
- Inaba, K. and R. M. Steinman (1984). "Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release." J Exp Med **160**(6): 1717-35.
- Inaba, K. and R. M. Steinman (1985). "Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells." Science **229**(4712): 475-9.
- Isaacs, J. D. and A. Thiel (2004). "Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Immune reconstitution." Best Pract Res Clin Haematol **17**(2): 345-58.
- Ishikawa, S., T. Sato, M. Abe, S. Nagai, N. Onai, H. Yoneyama, et al. (2001). "Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by C11b+CD11c+ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC." J Exp Med **193**(12): 1393-402.
- Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, et al. (2002). "The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo." J Exp Med **195**(10): 1289-302.
- Jacob, J., G. Kelsoe, K. Rajewsky and U. Weiss (1991). "Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres." NATURE **354**(6352): 389-392.
- Jager, U., Y. Zhao and C. D. Porter (1999). "Endothelial cell-specific transcriptional targeting from a hybrid long terminal repeat retrovirus vector containing human prepro-endothelin-1 promoter sequences." J Virol **73**(12): 9702-9.
- Jameson, S. C. (2002). "Maintaining the norm: T-cell homeostasis." Nat Rev Immunol **2**(8): 547-56.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.
- Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath and S. P. Schoenberger (2003). "CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes." Nature **421**(6925): 852-6.
- Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." J Exp Med **165**(2): 302-19.
- Jiang, H. and L. Chess (2004). "An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation." J Clin Invest **114**(9): 1198-208.
- Jiang, H., S. Curran, E. Ruiz-Vazquez, B. Liang, R. Winchester and L. Chess (2003). "Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8378-83.
- Jiang, H., S. I. Zhang and B. Pernis (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-5.



- Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, et al. (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." Hum Immunol **59**(11): 690-9.
- Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, et al. (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." Nature **375**(6527): 151-5.
- Jordan, M. S., M. P. Riley, H. von Boehmer and A. J. Caton (2000). "Anergy and suppression regulate CD4(+) T cell responses to a self peptide." Eur J Immunol **30**(1): 136-44.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, et al. (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity **17**(2): 211-20.
- Kaech, S. M., S. Hemby, E. Kersh and R. Ahmed (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." Cell **111**(6): 837-51.
- Kamel, O. W., M. van de Rijn, M. M. Hanasono and R. A. Warnke (1995). "Immunosuppression-associated lymphoproliferative disorders in rheumatic patients." Leuk Lymphoma **16**(5-6): 363-8.
- Kang, E. S. and J. Iacomini (2002). "Induction of central deletional T cell tolerance by gene therapy." J Immunol **169**(4): 1930-5.
- Karasuyama, H., A. Rolink, Y. Shinkai, F. Young, F. W. Alt and F. Melchers (1994). "The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice." Cell **77**(1): 133-43.
- Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki, et al. (2002). "Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression." J Immunol **168**(9): 4399-405.
- Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki, et al. (2002). "Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen: dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4+ autoreactive T cells after proliferation." J Immunol **168**(3): 1103-12.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso and L. Naldini (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Ke, Y. and J. A. Kapp (1996). "Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake." J Exp Med **184**(3): 1179-84.
- Kearney, E. R., K. A. Pape, D. Y. Loh and M. K. Jenkins (1994). "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." Immunity **1**(4): 327-39.
- Kerksiek, K. M., F. Niedergang, P. Chavrier, D. H. Busch and T. Brocker (2005). "Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo." Blood **105**(2): 742-9.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn and K. Rajewsky (1991). "A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene." Nature **350**(6317): 423-6.

- Klein, L., B. Roettinger and B. Kyewski (2001). "Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance." Eur J Immunol **31**(8): 2476-86.
- Kleindienst, P., I. Chretien, T. Winkler and T. Brocker (2000). "Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo." Blood **95**(8): 2610-6.
- Kong, F. K., C. L. Chen, A. Six, R. D. Hockett and M. D. Cooper (1999). "T cell receptor gene deletion circles identify recent thymic emigrants in the peripheral T cell pool." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1536-40.
- Kouskoff, V., H. J. Fehling, M. Lemeur, C. Benoist and D. Mathis (1993). "A vector driving the expression of foreign cDNAs in the MHC class II-positive cells of transgenic mice." J Immunol Methods **166**(2): 287-91.
- Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf and K. L. Rock (1993). "Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 4942-6.
- Kozmik, Z., S. Wang, P. Dorfler, B. Adams and M. Busslinger (1992). "The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP." Mol Cell Biol **12**(6): 2662-72.
- Kraunus, J., D. H. Schaumann, J. Meyer, U. Modlich, B. Fehse, G. Brandenburg, et al. (2004). "Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing." Gene Ther **11**(21): 1568-78.
- Kreuwel, H. T., S. Aung, C. Silao and L. A. Sherman (2002). "Memory CD8(+) T cells undergo peripheral tolerance." Immunity **17**(1): 73-81.
- Krisky, D. M., P. C. Marconi, T. Oligino, R. J. Rouse, D. J. Fink and J. C. Glorioso (1997). "Rapid method for construction of recombinant HSV gene transfer vectors." Gene Ther **4**(10): 1120-5.
- Kuhlcke, K., B. Fehse, A. Schilz, S. Loges, C. Lindemann, F. Ayuk, et al. (2002). "Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels." Mol Ther **5**(4): 473-8.
- Kunkel, E. J. and E. C. Butcher (2003). "Plasma-cell homing." Nat Rev Immunol **3**(10): 822-9.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." J Exp Med **186**(2): 239-45.
- Kurts, C., J. F. Miller, R. M. Subramaniam, F. R. Carbone and W. R. Heath (1998). "Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction." J Exp Med **188**(2): 409-14.
- Kurts, C., R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, et al. (1999). "CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12703-7.
- Kuwana, M. (2002). "Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets." Hum Immunol **63**(12): 1156-63.
- Lange, C. and T. Blankenstein (1997). "Loss of retroviral gene expression in bone marrow reconstituted mice correlates with down-regulation of gene expression in long-term culture initiating cells." Gene Ther **4**(4): 303-8.

- Lanoue, A., C. Bona, H. von Boehmer and A. Sarukhan (1997). "Conditions that induce tolerance in mature CD4+ T cells." J Exp Med **185**(3): 405-14.
- Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, et al. (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." Nat Immunol **2**(3): 261-8.
- Lauterbach, H., K. M. Kerksiek, D. H. Busch, E. Berto, A. Bozac, P. Mavromara, et al. (2004). "Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1." J Virol **78**(8): 4020-8.
- Lechler, R., J. G. Chai, F. Marelli-Berg and G. Lombardi (2001). "The contributions of T-cell anergy to peripheral T-cell tolerance." Immunology **103**(3): 262-9.
- Lechner, O., J. Lauber, A. Franzke, A. Sarukhan, H. von Boehmer and J. Buer (2001). "Fingerprints of anergic T cells." Curr Biol **11**(8): 587-95.
- Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell and K. Bottomly (1993). "Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo." J Immunol **151**(12): 6742-50.
- Li, M., G. M. Davey, R. M. Sutherland, C. Kurts, A. M. Lew, C. Hirst, et al. (2001). "Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo." J Immunol **166**(10): 6099-103.
- Li, Z., U. Modlich and C. Baum (2004). "Safety and efficacy in retrovirally modified haematopoietic cell therapy." Best Pract Res Clin Haematol **17**(3): 493-503.
- Liblau, R., E. Tournier-Lasserre, J. Maciazek, G. Dumas, O. Siffert, G. Hashim, et al. (1991). "T cell response to myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis patients and healthy subjects." Eur J Immunol **21**(6): 1391-5.
- Liblau, R. S., F. S. Wong, L. T. Mars and P. Santamaria (2002). "Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention." Immunity **17**(1): 1-6.
- Lind, E. F., S. E. Prockop, H. E. Porritt and H. T. Petrie (2001). "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development." J Exp Med **194**(2): 127-34.
- Lindquist, R. L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M. L. Dustin, et al. (2004). "Visualizing dendritic cell networks in vivo." Nat Immunol **5**(12): 1243-50.
- Linton, P. J., J. Harbertson and L. M. Bradley (2000). "A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells." J Immunol **165**(10): 5558-65.
- Liu, K., T. Iyoda, M. Saternus, Y. Kimura, K. Inaba and R. M. Steinman (2002). "Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ." J Exp Med **196**(8): 1091-7.
- Liu, Y., Y. Wu, L. Ramarathnam, Y. Guo, D. Huszar, M. Trunstin, et al. (1995). "Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response." Int Immunol **7**(8): 1353-62.
- Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini and N. Suci-Foca (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." Int Immunol **10**(6): 775-83.

- Lohmann, T., R. D. Leslie and M. Londei (1996). "T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes." J Autoimmun **9**(3): 385-9.
- Lotti, F., E. Menguzzato, C. Rossi, L. Naldini, L. Ailles, F. Mavilio, et al. (2002). "Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement." J Virol **76**(8): 3996-4007.
- Lutzko, C., D. Senadheera, D. Skelton, D. Petersen and D. B. Kohn (2003). "Lentivirus vectors incorporating the immunoglobulin heavy chain enhancer and matrix attachment regions provide position-independent expression in B lymphocytes." J Virol **77**(13): 7341-51.
- Maas, A., G. M. Dingjan, F. Grosveld and R. W. Hendriks (1999). "Early arrest in B cell development in transgenic mice that express the E41K Bruton's tyrosine kinase mutant under the control of the CD19 promoter region." J Immunol **162**(11): 6526-33.
- Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk and H. Jonuleit (2002). "Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells." Immunol Cell Biol **80**(5): 477-83.
- Mamalaki, C., M. Murdjeva, M. Tolaini, T. Norton, P. Chandler, A. Townsend, et al. (1996). "Tolerance in TCR/cognate antigen double-transgenic mice mediated by incomplete thymic deletion and peripheral receptor downregulation." Dev Immunol **4**(4): 299-315.
- Marodon, G., E. Mouly, E. J. Blair, C. Frisen, F. M. Lemoine and D. Klatzmann (2003). "Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene." Blood **101**(9): 3416-23.
- Martin, P., G. M. Del Hoyo, F. Anjuere, C. F. Arias, H. H. Vargas, L. A. Fernandez, et al. (2002). "Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential." Blood **100**(2): 383-90.
- Matsuzaki, G., H. M. Vordermeier, A. Hashimoto, K. Nomoto and J. Ivanyi (1999). "The role of B cells in the establishment of T cell response in mice infected with an intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*." Cell Immunol **194**(2): 178-85.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Matzinger, P. (1998). "An innate sense of danger." Semin Immunol **10**(5): 399-415.
- Mautino, M. R. and R. A. Morgan (2002). "Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA." Hum Gene Ther **13**(9): 1027-37.
- Mayordomo, L., J. L. Marenco, J. Gomez-Mateos and E. Rejon (2002). "Pulmonary miliary tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment." Scand J Rheumatol **31**(1): 44-5.
- McMahan, C. J. and P. J. Fink (1998). "RAG reexpression and DNA recombination at T cell receptor loci in peripheral CD4+ T cells." Immunity **9**(5): 637-47.
- Melchers, F., H. Karasuyama, D. Haasner, S. Bauer, A. Kudo, N. Sakaguchi, et al. (1993). "The surrogate light chain in B-cell development." Immunol Today **14**(2): 60-8.
- Miller, N. and J. Whelan (1997). "Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy." Hum Gene Ther **8**(7): 803-15.

- Miyoshi, H., U. Blomer, M. Takahashi, F. H. Gage and I. M. Verma (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." J Virol **72**(10): 8150-7.
- Montagnoli, C., A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, P. Mosci, A. H. Sharpe, et al. (2002). "B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*." J Immunol **169**(11): 6298-308.
- Moreau-Gaudry, F., P. Xia, G. Jiang, N. P. Perelman, G. Bauer, J. Ellis, et al. (2001). "High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors." Blood **98**(9): 2664-72.
- Morgan, D. J., H. T. Kruwel and L. A. Sherman (1999). "Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens." J Immunol **163**(2): 723-7.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" Immunity **19**(1): 5-8.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mueller, S. N., C. M. Jones, C. M. Smith, W. R. Heath and F. R. Carbone (2002). "Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus." J Exp Med **195**(5): 651-6.
- Mulligan, R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." Science **260**(5110): 926-32.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, et al. (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." J Clin Invest **114**(2): 280-90.
- Murakami, M., T. Tsubata, M. Okamoto, A. Shimizu, S. Kumagai, H. Imura, et al. (1992). "Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice." Nature **357**(6373): 77-80.
- Nadler, L. M., K. C. Anderson, G. Marti, M. Bates, E. Park, J. F. Daley, et al. (1983). "B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes." J Immunol **131**(1): 244-50.
- Najafian, N., T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, et al. (2003). "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." J Clin Invest **112**(7): 1037-48.
- Naldini, L. (1998). "Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells." Curr Opin Biotechnol **9**(5): 457-63.
- Nemazee, D. A. and K. Burki (1989). "Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes." Nature **337**(6207): 562-6.

- Neuberger, M. S., K. J. Patel, P. Dariavach, K. Nelms, C. J. Peaker and G. T. Williams (1993). "The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes." *Immunol Rev* **132**: 147-61.
- Nieuwenhuis, P. and W. L. Ford (1976). "Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes." *Cell Immunol* **23**(2): 254-67.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato and T. Honjo (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* **11**(2): 141-51.
- Norvell, A. and J. G. Monroe (1996). "Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM- and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes." *J Immunol* **156**(4): 1328-32.
- Nunez Martinez, O., C. Ripoll Noiseux, J. A. Carneros Martin, V. Gonzalez Lara and H. G. Gregorio Maranon (2001). "Reactivation tuberculosis in a patient with anti-TNF-alpha treatment." *Am J Gastroenterol* **96**(5): 1665-6.
- O'Garra, A. and G. Trinchieri (2004). "Are dendritic cells afraid of commitment?" *Nat Immunol* **5**(12): 1206-8.
- Osmond, D. G. (1993). "The turnover of B-cell populations." *Immunol Today* **14**(1): 34-7.
- Palmer, E. (2003). "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 383-91.
- Pape, K. A., E. R. Kearney, A. Khoruts, A. Mondino, R. Merica, Z. M. Chen, et al. (1997). "Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo." *Immunol Rev* **156**: 67-78.
- Pape, K. A., R. Merica, A. Mondino, A. Khoruts and M. K. Jenkins (1998). "Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance." *J Immunol* **160**(10): 4719-29.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott and D. Baltimore (1993). "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18): 8392-6.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X. X. Zheng, T. B. Strom and A. K. Abbas (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." *Immunity* **6**(4): 411-7.
- Popa, I., M. E. Harris, J. E. Donello and T. J. Hope (2002). "CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element." *Mol Cell Biol* **22**(7): 2057-67.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." *Immunity* **18**(5): 713-20.
- Pugliese, A., D. Brown, D. Garza, D. Murchison, M. Zeller, M. Redondo, et al. (2001). "Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs." *J Clin Invest* **107**(5): 555-64.
- Qin, Z., G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao and T. Blankenstein (1998). "B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity." *Nat Med* **4**(5): 627-30.

- Radic, M. Z., J. Erikson, S. Litwin and M. Weigert (1993). "B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors." J Exp Med **177**(4): 1165-73.
- Ramezani, A., T. S. Hawley and R. G. Hawley (2000). "Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells." Mol Ther **2**(5): 458-69.
- Redmond, W. L., J. Hernandez and L. A. Sherman (2003). "Deletion of naive CD8 T cells requires persistent antigen and is not programmed by an initial signal from the tolerogenic APC." J Immunol **171**(12): 6349-54.
- Redmond, W. L., B. C. Marincek and L. A. Sherman (2005). "Distinct Requirements for Deletion versus Anergy during CD8 T Cell Peripheral Tolerance In Vivo." J Immunol **174**(4): 2046-53.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, et al. (1999). "Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization." J Exp Med **189**(2): 371-80.
- Richardson, T. B., J. Kaspers and C. D. Porter (2004). "Retroviral hybrid LTR vector strategy: functional analysis of LTR elements and generation of endothelial cell specificity." Gene Ther **11**(9): 775-83.
- Riviere, I., K. Brose and R. C. Mulligan (1995). "Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6733-7.
- Rocha, B., A. Grandien and A. A. Freitas (1995). "Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance." J Exp Med **181**(3): 993-1003.
- Rocha, B. and H. von Boehmer (1991). "Peripheral selection of the T cell repertoire." Science **251**(4998): 1225-8.
- Rock, K. L., S. Gamble, L. Rothstein and B. Benacerraf (1991). "Reassociation with beta 2-microglobulin is necessary for Db class I major histocompatibility complex binding of an exogenous influenza peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 301-4.
- Rock, K. L., S. Gamble, L. Rothstein, C. Gramm and B. Benacerraf (1991). "Dissociation of beta 2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface." Cell **65**(4): 611-20.
- Rock, K. L., L. E. Rothstein, S. R. Gamble and B. Benacerraf (1990). "Reassociation with beta 2-microglobulin is necessary for Kb class I major histocompatibility complex binding of exogenous peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7517-21.
- Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen and M. Croft (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." Immunity **15**(3): 445-55.
- Rolink, A., U. Grawunder, T. H. Winkler, H. Karasuyama and F. Melchers (1994). "IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development." Int Immunol **6**(8): 1257-64.
- Rolink, A., A. Kudo, H. Karasuyama, Y. Kikuchi and F. Melchers (1991). "Long-term proliferating early pre B cell lines and clones with the potential to develop to surface Ig-positive, mitogen reactive B cells in vitro and in vivo." Embo J **10**(2): 327-36.

- Rolink, A. and F. Melchers (1996). "B-cell development in the mouse." *Immunol Lett* **54**(2-3): 157-61.
- Rolink, A. G., E. ten Boekel, T. Yamagami, R. Ceredig, J. Andersson and F. Melchers (1999). "B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells." *Immunol Lett* **68**(1): 89-93.
- Ronchese, F. and B. Hausmann (1993). "B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes." *J Exp Med* **177**(3): 679-90.
- Ronchetti, A., P. Rovere, G. Iezzi, G. Galati, S. Heltai, M. P. Protti, et al. (1999). "Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines." *J Immunol* **163**(1): 130-6.
- Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist and D. Mathis (1997). "Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses." *Immunity* **7**(1): 123-34.
- Rosenthal, A. S. and E. M. Shevach (1973). "Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes." *J Exp Med* **138**(5): 1194-212.
- Rush, C., T. Mitchell and P. Garside (2002). "Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways." *J Immunol* **169**(9): 4951-60.
- Salmon, P., V. Kindler, O. Ducrey, B. Chapuis, R. H. Zubler and D. Trono (2000). "High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors." *Blood* **96**(10): 3392-8.
- Saoudi, A., S. Simmonds, I. Huitinga and D. Mason (1995). "Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells." *J Exp Med* **182**(2): 335-44.
- Sato, S., D. A. Steeber, P. J. Jansen and T. F. Tedder (1997). "CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19." *J Immunol* **158**(10): 4662-9.
- Schambach, A., H. Wodrich, M. Hildinger, J. Bohne, H. G. Krausslich and C. Baum (2000). "Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors." *Mol Ther* **2**(5): 435-45.
- Schirmacher, V., M. Feuerer, P. Fournier, T. Ahlert, V. Umansky and P. Beckhove (2003). "T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity." *Trends Mol Med* **9**(12): 526-34.
- Schuler, G. and R. M. Steinman (1985). "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro." *J Exp Med* **161**(3): 526-46.
- Schulz, O. and C. Reis e Sousa (2002). "Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells." *Immunology* **107**(2): 183-9.
- Schwenter, F., N. Deglon and P. Aebischer (2003). "Optimization of human erythropoietin secretion from MLV-infected human primary fibroblasts used for encapsulated cell therapy." *J Gene Med* **5**(3): 246-57.



- Scollay, R. and D. I. Godfrey (1995). "Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips?" Immunol Today **16**(6): 268-73; discussion 273-4.
- Semana, G., R. Gausling, R. A. Jackson and D. A. Hafler (1999). "T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects." J Autoimmun **12**(4): 259-67.
- Serra, P., A. Amrani, B. Han, J. Yamanouchi, S. J. Thiessen and P. Santamaria (2002). "RAG-dependent peripheral T cell receptor diversification in CD8+ T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15566-71.
- Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker and T. L. Delovitch (2002). "Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes." Ann N Y Acad Sci **958**: 77-88.
- Shedlock, D. J. and H. Shen (2003). "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." Science **300**(5617): 337-9.
- Shen, H., J. K. Whitmire, X. Fan, D. J. Shedlock, S. M. Kaech and R. Ahmed (2003). "A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*." J Immunol **170**(3): 1443-51.
- Smith, K. M., D. C. Olson, R. Hirose and D. Hanahan (1997). "Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance." Int Immunol **9**(9): 1355-65.
- Somia, N. and I. M. Verma (2000). "Gene therapy: trials and tribulations." Nat Rev Genet **1**(2): 91-9.
- Soriano, P., G. Friedrich and P. Lawinger (1991). "Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells." J Virol **65**(5): 2314-9.
- Srivastava, P. (2002). "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **2**(3): 185-94.
- Stefanski, H. E., D. Mayerova, S. C. Jameson, K. A. Hogquist and M. J. Bevan (2001). "A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo
- Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8+ T cells." J Immunol **166**(11): 6602-7.
- Steinman, L. (1993). "Autoimmune disease." Sci Am **269**(3): 106-14.
- Steinman, L. (2004). "Immune therapy for autoimmune diseases." Science **305**(5681): 212-6.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein and S. Nagata (1993). "Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family." Cell **75**(6): 1169-78.
- Sun, J. C., M. A. Williams and M. J. Bevan (2004). "CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection." Nat Immunol **5**(9): 927-33.
- Tarner, I. H. and C. G. Fathman (2002). "The potential for gene therapy in the treatment of autoimmune disease." Clin Immunol **104**(3): 204-16.

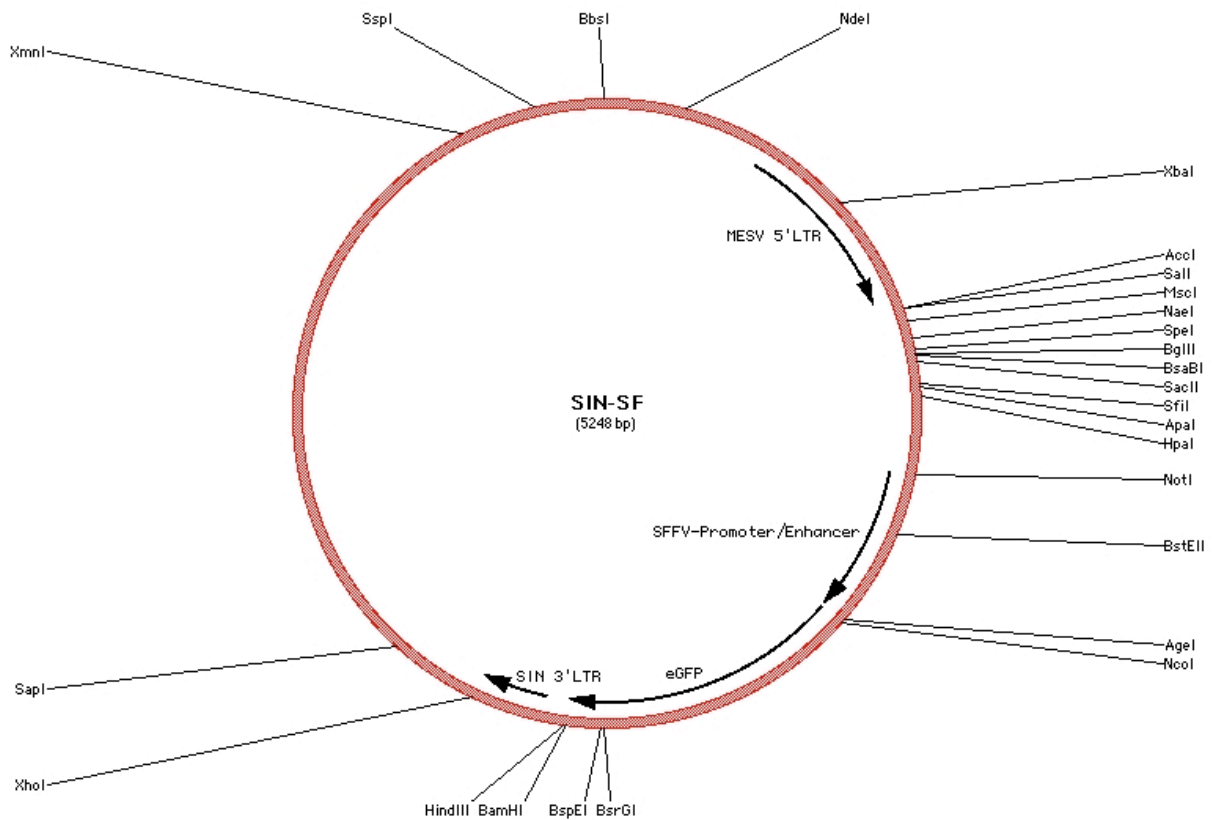
- Tedder, T. F. and C. M. Isaacs (1989). "Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily." J Immunol **143**(2): 712-7.
- Thomsen, A. R., J. Johansen, O. Marker and J. P. Christensen (1996). "Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice." J Immunol **157**(7): 3074-80.
- Throsby, M., F. Homo-Delarche, D. Chevenne, R. Goya, M. Dardenne and J. M. Pleau (1998). "Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages." Endocrinology **139**(5): 2399-406.
- Tiegs, S. L., D. M. Russell and D. Nemazee (1993). "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells." J Exp Med **177**(4): 1009-20.
- Topham, D. J., R. A. Tripp, A. M. Hamilton-Easton, S. R. Sarawar and P. C. Doherty (1996). "Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4+ T cell memory in the absence of B cells and Ig." J Immunol **157**(7): 2947-52.
- Tse, H. Y., R. H. Schwartz and W. E. Paul (1980). "Cell-cell interactions in the T cell proliferative response. I. Analysis of the cell types involved and evidence for nonspecific T cell recruitment." J Immunol **125**(2): 491-500.
- Turka, L. A., D. G. Schatz, M. A. Oettinger, J. J. Chun, C. Gorka, K. Lee, et al. (1991). "Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking." Science **253**(5021): 778-81.
- Valdez, Y., W. Mah, M. M. Winslow, L. Xu, P. Ling and S. E. Townsend (2002). "Major histocompatibility complex class II presentation of cell-associated antigen is mediated by CD8alpha+ dendritic cells in vivo." J Exp Med **195**(6): 683-94.
- van Bekkum, D. W. (1998). "New opportunities for the treatment of severe autoimmune diseases: bone marrow transplantation." Clin Immunol Immunopathol **89**(1): 1-10.
- van Bekkum, D. W. (2004). "Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Preclinical experiments." Best Pract Res Clin Haematol **17**(2): 201-22.
- van Essen, D., P. Dullforce, T. Brocker and D. Gray (2000). "Cellular interactions involved in Th cell memory." J Immunol **165**(7): 3640-6.
- Van Parijs, L., A. Biuckians, A. Ibragimov, F. W. Alt, D. M. Willerford and A. K. Abbas (1997). "Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor." J Immunol **158**(8): 3738-45.
- Venanzi, E. S., C. Benoist and D. Mathis (2004). "Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity." Curr Opin Immunol **16**(2): 197-202.
- Vogel, A., C. P. Strassburg, P. Obermayer-Straub, G. Brabant and M. P. Manns (2002). "The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components." J Mol Med **80**(4): 201-11.
- von Boehmer, H. and H. J. Fehling (1997). "Structure and function of the pre-T cell receptor." Annu Rev Immunol **15**: 433-52.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." Nat Rev Immunol **2**(1): 11-9.

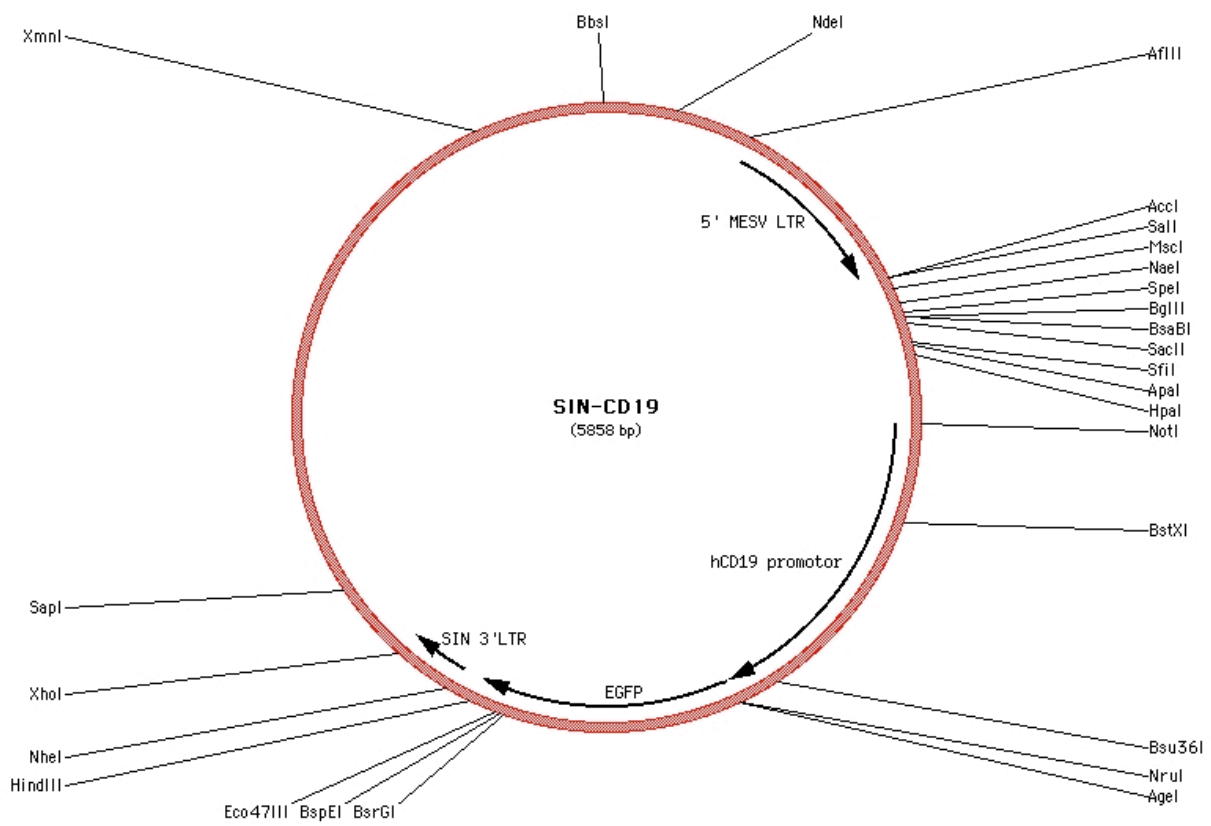
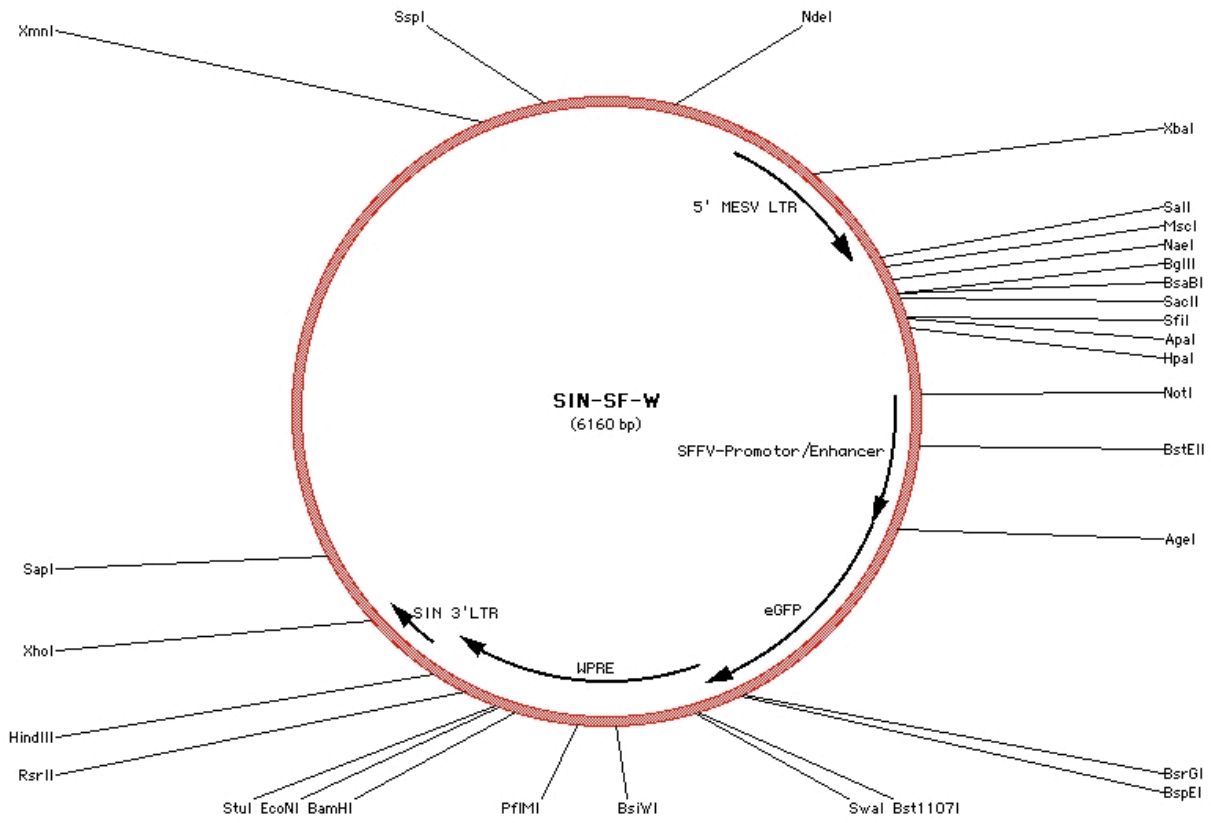
- Walunas, T. L. and J. A. Bluestone (1998). "CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo." J Immunol **160**(8): 3855-60.
- Wang, H., M. P. Kavanaugh, R. A. North and D. Kabat (1991). "Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter." Nature **352**(6337): 729-31.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and S. Nagata (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**(6367): 314-7.
- Weiss, R. A. and C. S. Taylor (1995). "Retrovirus receptors." Cell **82**(4): 531-3.
- Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, et al. (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." Nat Immunol **4**(3): 225-34.
- Wilson, A., W. Held and H. R. MacDonald (1994). "Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes." J Exp Med **179**(4): 1355-60.
- Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, et al. (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." Nat Med **7**(3): 297-303.
- Wolkers, M. C., N. Brouwenstijn, A. H. Bakker, M. Toebes and T. N. Schumacher (2004). "Antigen bias in T cell cross-priming." Science **304**(5675): 1314-7.
- Xu, B. and D. W. Scott (2004). "A novel retroviral gene therapy approach to inhibit specific antibody production and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis induced by MOG and MBP." Clin Immunol **111**(1): 47-52.
- Yam, P. Y., S. Li, J. Wu, J. Hu, J. A. Zaia and J. K. Yee (2002). "Design of HIV vectors for efficient gene delivery into human hematopoietic cells." Mol Ther **5**(4): 479-84.
- Yamagata, T., D. Mathis and C. Benoist (2004). "Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells." Nat Immunol **5**(6): 597-605.
- Yang, N. S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell and D. McCabe (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9568-72.
- Yee, J. K., J. C. Moores, D. J. Jolly, J. A. Wolff, J. G. Respass and T. Friedmann (1987). "Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5197-201.
- Young, D. A., L. D. Lowe, S. S. Booth, M. J. Whitters, L. Nicholson, V. K. Kuchroo, et al. (2000). "IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **164**(7): 3563-72.
- Youngman, K. R., M. A. Franco, N. A. Kuklin, L. S. Rott, E. C. Butcher and H. B. Greenberg (2002). "Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response." J Immunol **168**(5): 2173-81.

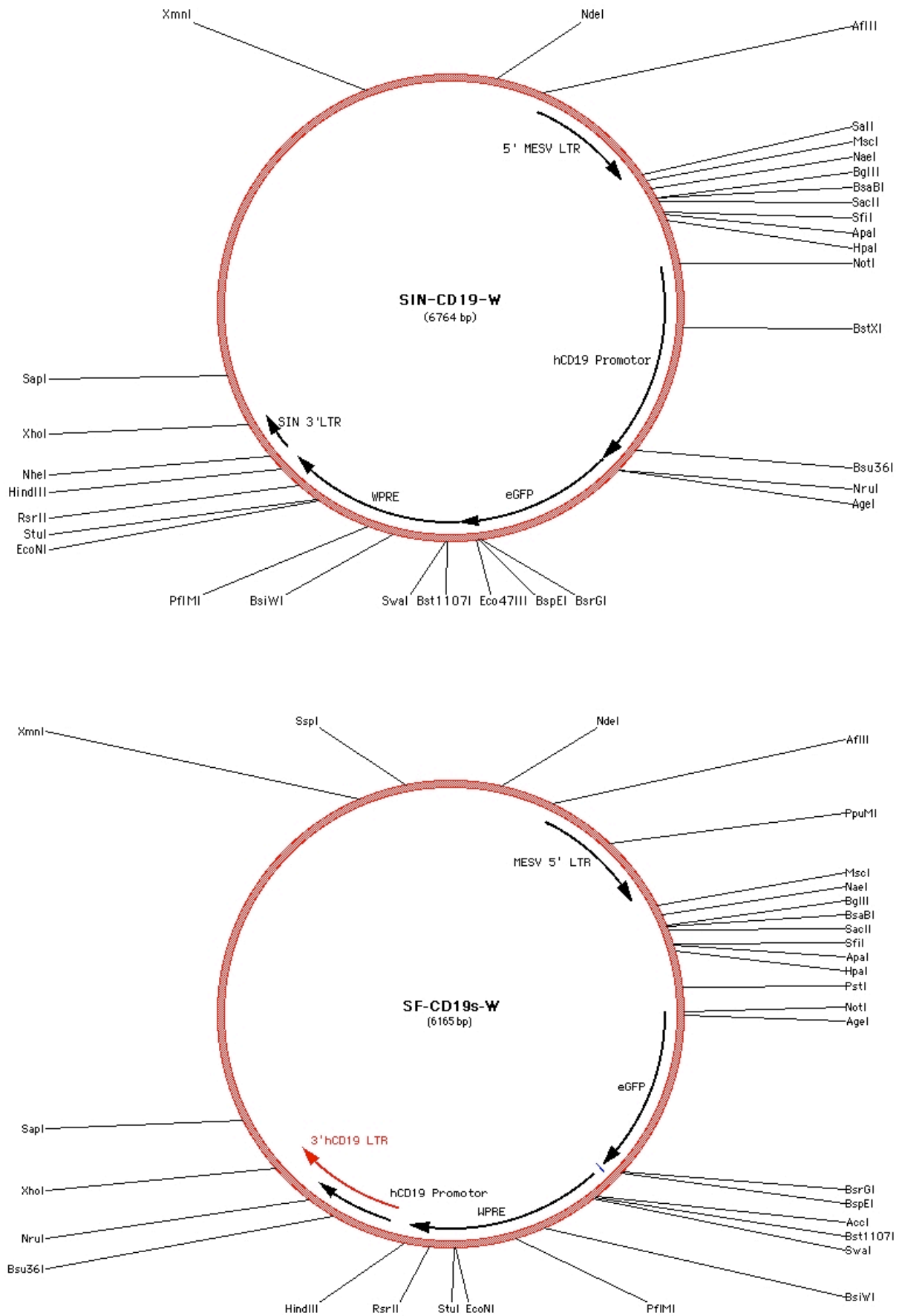
- Yu, S. F., T. von Ruden, P. W. Kantoff, C. Garber, M. Seiberg, U. Ruther, et al. (1986). "Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3194-8.
- Zaiss, A. K., S. Son and L. J. Chang (2002). "RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy." J Virol **76**(14): 7209-19.
- Zhao-Emonet, J. C., G. Marodon, C. Pioche-Durieu, F. L. Cosset and D. Klatzmann (2000). "T cell-specific expression from Mo-MLV retroviral vectors containing a CD4 mini-promoter/enhancer." J Gene Med **2**(6): 416-25.
- Zhou, L. J., H. M. Smith, T. J. Waldschmidt, R. Schwarting, J. Daley and T. F. Tedder (1994). "Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development." Mol Cell Biol **14**(6): 3884-94.
- Zinkernagel, R. M. (1996). "Immunology taught by viruses." Science **271**(5246): 173-8.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.
- Zufferey, R., J. E. Donello, D. Trono and T. J. Hope (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol **73**(4): 2886-92.
- Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini, et al. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol **72**(12): 9873-80.

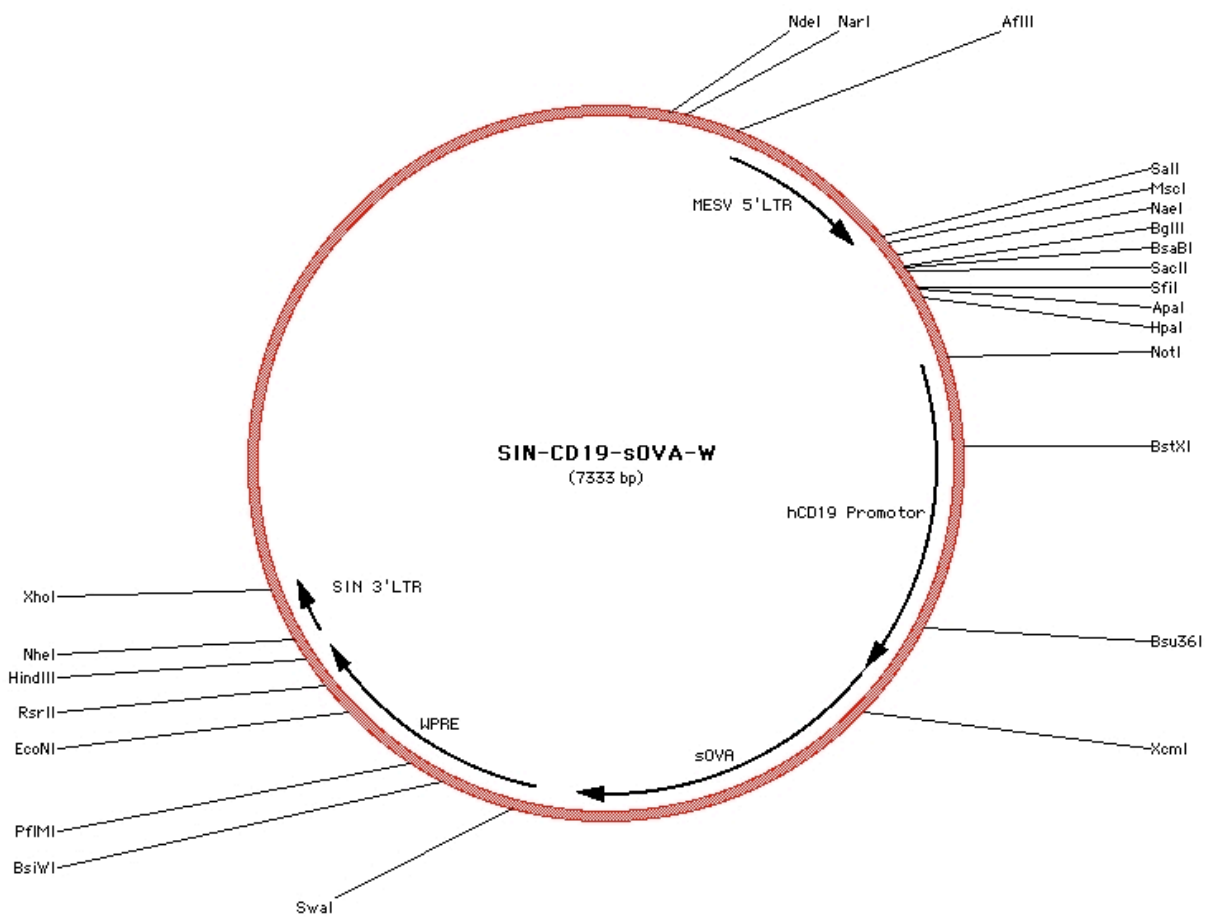
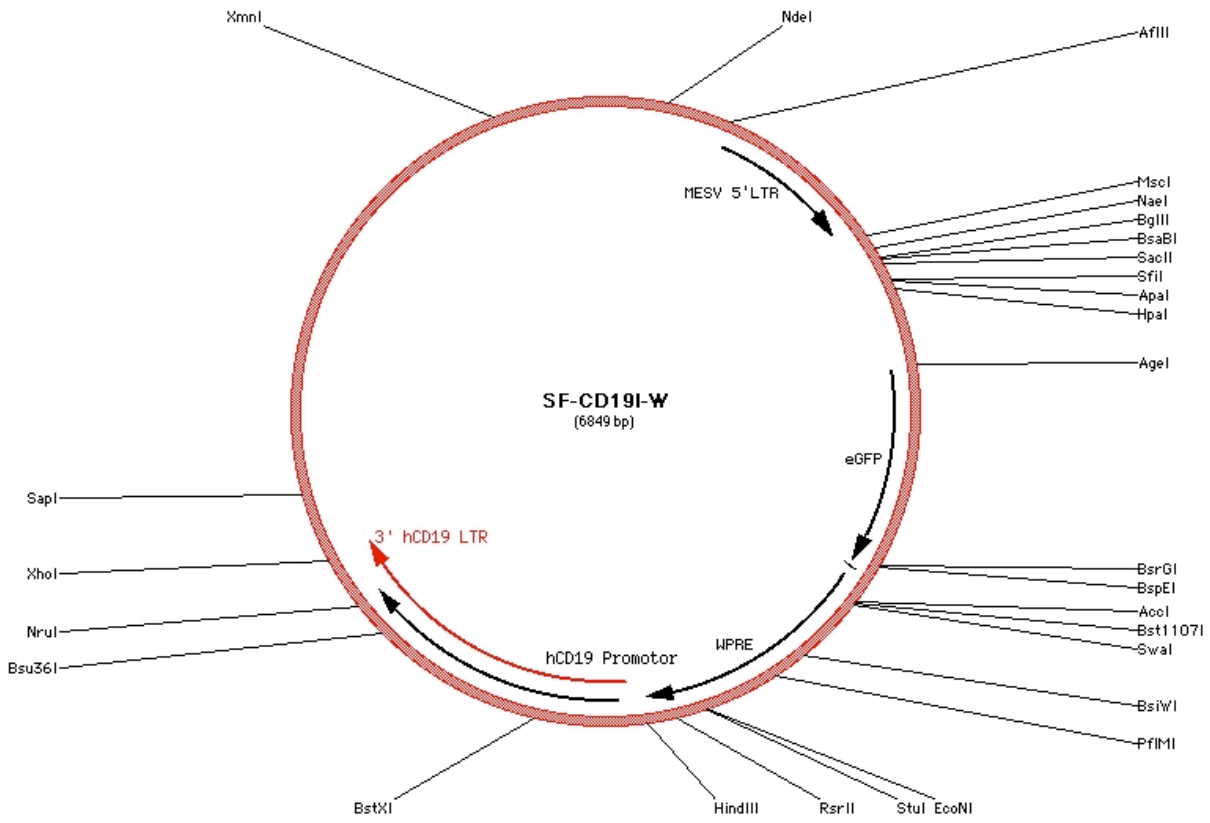
## 8 ANHANG

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren sind in Form von Plasmidkarten dargestellt. Restriktionsschnittstellen, die nur einmal im Vektor vorkommen, sind eingezeichnet. Der MESV-LTR (*murine embryonic stem cell virus*) leitet sich vom LTR des Moloney-Maus-Leukämie-Virus ab. Alle Plasmide tragen das Ampicillin-Resistenzgen.

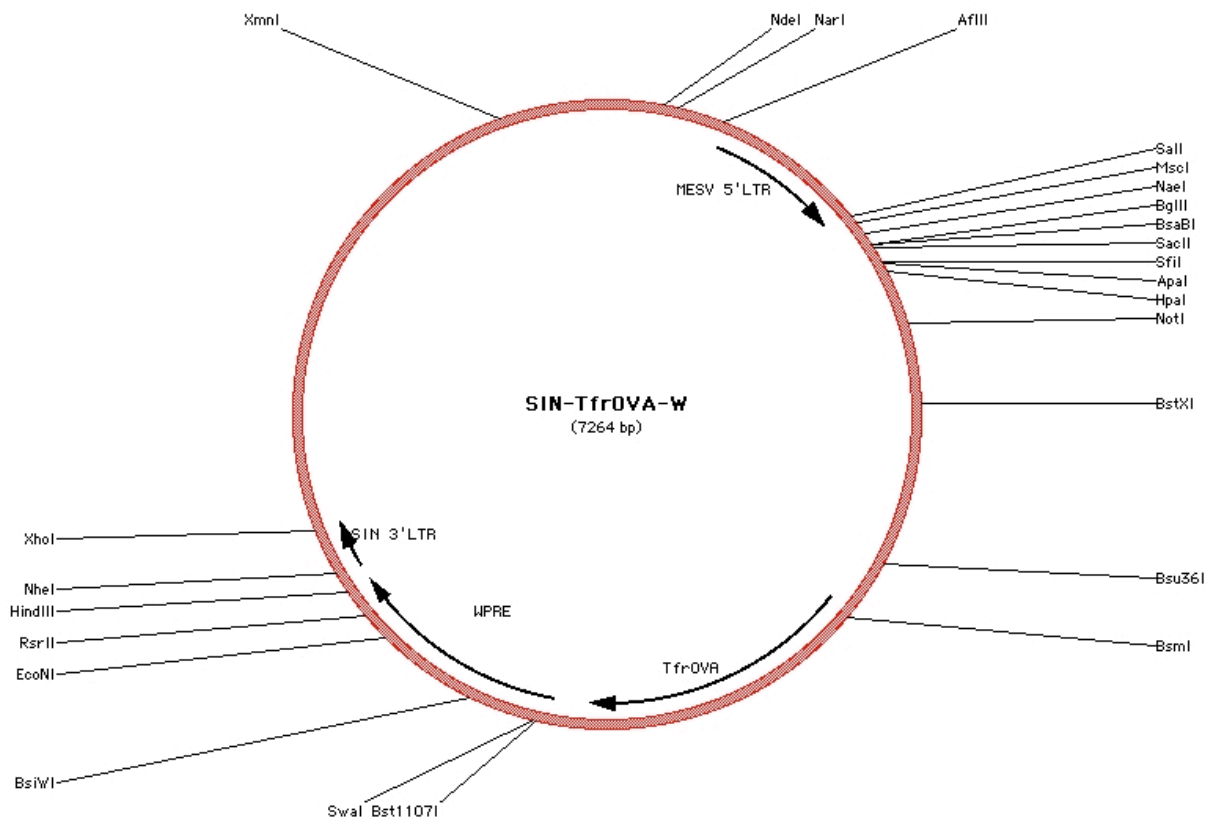












## 9 DANKSAGUNG

**Frau Prof. E. Weiß** danke ich herzlich für ihre Bereitschaft die offizielle Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen und den damit verbundenen zeitlichen Aufwand, wodurch sie mir die Promotion an der biologischen Fakultät der Universität München ermöglichte.

**Herrn Prof. T. Brocker** möchte ich für die Möglichkeit danken meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Besonders geschätzt habe ich die wissenschaftliche und konzeptionelle Freiheit, welche er mir während unserer Zusammenarbeit eingeräumt hat. Auch möchte ich mich für die zahlreichen Möglichkeiten bedanken an nationalen und internationalen Fachkongressen teilzunehmen.

**Herrn Prof. C. Baum** danke ich nicht nur für die Bereitstellung der Ausgangskonstrukte der retroviralen Vektoren, sondern auch insbesondere für sein jederzeit offenes Ohr bei technischen oder konzeptionellen Fragen.

**Meinen Kollegen** in der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche und aufheiternde Atmosphäre, welche geholfen hat mich über manche Durststrecke zu tragen. Besonders hervorheben möchte ich auch die stetige Hilfsbereitschaft, auf welche man sich immer verlassen konnte. Geduldig haben sie mein ausbreitendes Wesen auf Computer-Arbeitsplätze während des Zusammenschreibens meiner Dissertation toleriert. Michael Cannarile danke ich herzlich für sein akribisches und kritisches Korrekturlesen meiner Arbeit. Adam Nopora danke ich für sein ausgleichendes ruhiges Wesen in unserem „Zweier-Labor“.

**Andrea Bol** und **Wolfgang Mertl** haben sich während all den Jahren ausgezeichnet und sehr verlässlich um meine Versuchstiere gekümmert. Besonders wertvoll war und ist Andreas vorausschauende Planung der Zuchten, so dass meistens die entsprechenden Stämme auch für kurzfristig eingeschobene Experimente zur Verfügung standen.

**Frau Wolf, Frau Kozar** und **Frau Mair** sei herzlich gedankt für Ihre Unterstützung bei allen administrativen und organisatorischen Hindernissen. Frau Wolf möchte ich auch für die rasche Erledigung meiner eigentlich immer dringenden Bestellungen danken.

**Kathrin** möchte ich für die unschätzbaren und wertvollen Abende danken, in denen wir den Westpark durchpflügten und für die geistige und körperliche Balance sorgten.

**Meinen Eltern** und **Geschwistern** angemessen zu danken ist schwer, da sie mich seit so vielen Jahren begleiten und auf so vielfältige Weise unterstützen und stärken. Ich weiß die Werte, welche sie mir vermittelt haben sehr zu schätzen sowie das Gefühl zu wissen, dass es immer ein Zuhause gibt.

**Christoph** möchte ich ganz speziell für seine Liebe, Wärme und die Freude in unserem gemeinsamen Leben danken und dafür, dass ich mit ihm die wirklich wichtigen Dinge im Leben erfahren darf.

## 10 LEBENS LAUF

<b>Adresse</b>	Ohlstadterstr. 38 81373 München
<b>Geburtsdatum</b>	06.06.1976
<b>Nationalität</b>	deutsch
<b>Familiärer Stand</b>	ledig

### AUSBILDUNG

---

seit 02/2001	Promotion am Institut für Immunologie, München, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Brocker (Abteilung: Analyse der zellulären Interaktion während der Immunantwort <i>in vivo</i> )
01/2001	Diplom in Biologie (Note: 1,1)
11/1999 - 8/2000	Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Immunbiologie Freiburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Reth (Abteilung: Molekulare Immunologie)
09/1998 - 05/1999	Biologie-Studium an der University of Western Ontario in London, Kanada
02/1998 - 01/2001	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
10/1997 - 01/2001	Biologie-Studium (Diplom) an der Albert-Ludwigs Universität, Freiburg
10/1995 - 09/1997	Biologie-Studium (Diplom) an der Universität Ulm
06/1995	Abitur (Note: 1,6), St.-Hildegard Gymnasium, Ulm

### VERÖFFENTLICHUNGEN

---

**Werner M**, Kraunus J, Baum C and Brocker T (2004). B-cell-specific transgene expression using a self-inactivating retroviral vector with human CD19 promoter and viral post-transcriptional regulatory element. *Gene Ther*, 11 (12): 992-1000.

**Werner M** and Brocker T. Tolerance induction in CD8<sup>+</sup> T cells by gene-modified B cells. Manuskript in Vorbereitung.

Berg RW, **Werner M**, Ferguson PJ, Postenka C, Vincent M, Koropatnick DJ, Behrend E (2001). Tumor growth inhibition *in vivo* and G2/M cell cycle arrest induced by antisense oligodesoxynucleotide targeting thymidylate synthase. *J Pharmacol Exp Ther*, 298 (2): 447-84.

### STIPENDIUM

---

06/1998 - 01/2001	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
-------------------	---