

Die RR-Maus

Ein T-Zell-Rezeptor-transgenes Mausmodell für spontane schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Bernadette Pöllinger

München, September 2007

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, mit Ausnahme von Teilen der Immunhistologie, selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen beziehungsweise einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

München, September 2007

Dissertation eingereicht: September 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2008

Erstgutachter:

Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter:

Prof. Ch. David

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
2.1	T-Zell-Rezeptor und MHC	3
2.1.1	Der MHC	3
2.1.2	Der T-Zell-Rezeptor	6
2.1.2.1	Die Somatische Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Gene	6
2.1.2.2	Die T-Zell-Reifung	8
2.1.2.3	Aufbau und Signalgebung des TZR:CD3-Komplexes	10
2.1.2.4	Ausbildung von T-Effektorzellen	13
2.2	Autoimmunität	15
2.2.1	Multiple Sklerose	16
2.2.1.1	Einführung zur Multiplen Sklerose	16
2.2.1.2	Die Rolle genetischer Faktoren in der Multiplen Sklerose	17
2.2.1.3	Bedeutung von Umweltfaktoren	18
2.2.1.4	Klinischer Verlauf der Multiplen Sklerose	19
2.2.1.5	Pathophysiologie der Multiplen Sklerose	21
2.2.1.6	Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose	23
2.2.2	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis	24
2.2.2.1	Einführung in die EAE	24
2.2.2.2	Induzierte EAE-Modelle in der Maus	25
2.2.2.3	Transgene Mausmodelle	26
2.2.3	Immunologische Grundlagen der Multiplen Sklerose und EAE	29
2.2.3.1	Autoantigene in Multipler Sklerose und EAE	29
2.2.3.2	„Epitope Spreading“	33
2.2.3.3	Immunologische Vorgänge in Multipler Sklerose und EAE	34
3.	Fragestellung	38
4.	Material und Methoden	40
4.1	Material	40
4.1.1	Bakterienstämme und Mauslinien	40
4.1.2	T-Zelllinien und T-Zellklone	41
4.1.3	Plasmide und Oligonukleotide	45
4.1.4	Peptide	49
4.1.5	Antikörper	50
4.1.6	Enzyme und Kit-Systeme	54
4.1.7	Nährmedien	55
4.1.8	Chemikalien	56
4.1.9	Puffer und Lösungen	57
4.1.10	Geräte und Materialien	58
4.1.11	Computerprogramme	58

4.2 Methoden	59
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	59
4.2.1.1 Präparation von DNA	59
4.2.1.1.1 Plasmid-Isolation aus <i>E. coli</i>	59
4.2.1.1.2 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	59
4.2.1.1.3 Präparation von DNA zur Pronukleusinjektion	59
4.2.1.1.4 Ergebnis der Pronukleusinjektion zur Herstellung TZR-C3-transgener Tiere	61
4.2.1.1.5 Gewinnung genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie	62
4.2.1.2 Präparation von RNA	62
4.2.1.2.1 Präparation von RNA aus T-Zellen	62
4.2.1.2.2 Präparation von RNA aus Organen	62
4.2.1.2.3 Präparation von RNA aus peripheren Blutzellen	63
4.2.1.3 cDNA-Synthese	63
4.2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	63
4.2.1.5 Sequenzierung von DNA	64
4.2.1.6 Enzymatische Behandlung von DNA	64
4.2.1.6.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	64
4.2.1.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	64
4.2.1.6.3 Ligation	64
4.2.1.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	65
4.2.1.8 Identifizierung TZR-C3-transgener Mäuse	66
4.2.1.9 Transformationskontrolle in <i>E. coli</i> mit PCR	66
4.2.1.10 Real-Time-PCR	67
4.2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese	67
4.2.1.12 Visualisierung von DNA und RNA	68
4.2.1.13 Generation von Punktmutanten mit dem Quick-Change TM -Site-Directed-Mutagenesis-Kit	68
4.2.1.14 Klonierungsstrategie für die Herstellung der transgenen pHSE3'-V α 8.3- und pHSE3'-V β 4-Konstrukte	68
4.2.2 Biochemische Methoden	71
4.2.2.1 Rekombinante Herstellung der extrazellulären Domäne von MOG, MOG ₁₋₁₂₅ , in <i>E. coli</i> -„Inclusion bodies“	71
4.2.2.2 Reinigung von Antikörpern	72
4.2.2.3 Proteinquantifizierung nach Bradford (1976)	72
4.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung	72
4.2.3 Mikrobiologische Methoden	74
4.2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	74
4.2.3.2 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	74
4.2.4 Zellbiologische Methoden	74
4.2.4.1 Auftauen von Zellen	74
4.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	74
4.2.4.3 Kultivierung von T-Zelllinien	75
4.2.4.4 Herstellung von T-Zellklonen	75
4.2.4.5 Proliferationsassays	76
4.2.4.6 Einfrieren von T-Zellen	76
4.2.4.7 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem ZNS	76

4.2.5 Immunologische Methoden	77
4.2.5.1 FACS	77
4.2.5.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen	77
4.2.5.3 Intrazelluläre Färbung zum Nachweis von FoxP3 ⁺ -T-Zellen	78
4.2.5.4 ELISA	78
4.2.6 Arbeiten mit (transgenen) Mäusen	80
4.2.6.1 Tierhaltung	80
4.2.6.2 Genotypisierung	80
4.2.6.3 Gewinnung von Serum	80
4.2.6.4 Immunisierung von Mäusen	80
4.2.6.5 Adoptiver Transfer	81
4.2.6.6 Bestimmung des EAE-Krankheitsgrades	81
4.2.7 Immunhistologie	82

5.	Ergebnisse	83
5.1	Herstellung MOG-spezifischer TZR-C3-transgener Mäuse	83
5.1.1	Charakterisierung des MOG-spezifischen T-Zellklons C3	83
5.1.2	Klonierung der V α 8.3- und V β 4-Kette des T-Zell-Rezeptors und Herstellung TZR-C3-transgener Mäuse	88
5.2	Charakterisierung MOG-spezifischer TZR-C3-transgener SJL-Mäuse	91
5.2.1	Oberflächen-Expression des T-Zell-Rezeptors im Thymus von TZR-C3-transgenen Mäusen	91
5.2.2	Oberflächen-Expression des T-Zell-Rezeptors in der Milz von TZR-C3-transgenen Mäusen	95
5.2.3	Milzzellen von TZR-C3-transgenen Mäusen sind spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₀₋₁₁₀ und sezernieren T _H 1- und T _H 17-Zytokine	98
5.2.4	Charakterisierung der TCR ^{hoch} - und TCR ^{niedrig} -Population innerhalb TZR-C3-transgener T-Zellen	102
5.2.5	Nur TCR ¹⁶⁴⁰ -Mäuse zeigen nach Immunisierung mit MOG ₁₋₁₂₅ bzw. CFA eine erhöhte EAE-Inzidenz	105
5.3	Spontane EAE in TZR-C3-transgenen Tieren – die RR-Maus	107
5.3.1	TZR-C3-transgene SJL/J-Mäuse entwickeln spontan EAE	107
5.3.2	Spontane EAE in doppelt-transgenen TZR-C3 x IgH ^{MOG} -SJL/J-Mäusen	110
5.3.3	Die spontane EAE folgt einem progredienten oder schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf	112
	a.) Schubförmig-remittierender Verlauf mit vollständiger Remission	112
	b.) Schubförmig-remittierender Verlauf mit partieller Remission	113
	c.) Progredienter Verlauf der spontanen EAE	113
5.3.4	Studien zum „Epitope Spreading“: Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien aus TZR-C3-transgenen Mäusen	115
5.3.5	ZNS-Läsionen von spontan erkrankten TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren ähneln denen von Multiple-Sklerose-Patienten	119
5.3.6	ZNS-Infiltrate bestehen aus M ϕ , T-Zellen und B-Zellen	123
5.3.7	ZNS-infiltrierende T-Zellen sind stark aktiviert	124
5.3.8	An der spontanen EAE von TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren sind T _H 1- und T _H 17-Zellen beteiligt	125
5.3.9	Subklinische Infiltrate und Demyelinisierung in gesunden TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren	127
5.3.10	Analyse des Zytokinprofils im ZNS mit Real-time-PCR	128
5.3.11	CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ -T _{Reg} -Zellen in TZR-C3-transgenen Tieren	129
5.3.12	Veränderungen im peripheren Immunsystem von spontan erkrankten TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren	131
5.4	Die Rolle der B-Zellen in TZR-C3-transgenen Tieren	132
5.4.1	MOG-spezifische B-Zellen präsentieren in doppelt-transgenen TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} -Tieren bevorzugt MOG ₁₋₁₂₅	132
5.4.2	Anti-MOG-Autoantikörper in doppelt-transgenen TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} -Tieren	135
5.4.3	Immunglobuline in ZNS-Läsionen von TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} - und TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren	137
5.4.4	MOG-spezifische Autoantikörper in TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren	140

6.	Diskussion	147
6.1	Herstellung MOG-spezifischer TZR-C3-transgener Mäuse	149
6.2	TCR ¹⁶⁴⁰ , TCR ¹⁶³⁹ and TCR ¹⁵⁸⁶ : drei transgene Mauslinien mit unterschiedlicher Penetranz des transgenen T-Zell-Rezeptors	151
6.3	Spontane EAE in TZR-C3-transgenen Tieren	155
	6.3.1 Inzidenz der spontanen EAE	155
	6.3.2 Verlauf der spontanen EAE	157
	6.3.3 Pathophysiologie der spontanen EAE	159
6.4	Rolle der B-Zellen und Autoantikörper in der spontanen EAE von TCR ¹⁶⁴⁰ -Tieren	162
6.5	Vergleich der <i>RR-Maus</i> mit Multiple-Sklerose-Patienten	166
7.	Literaturverzeichnis	168
8.	Anhang	179
8.1	DNA-Sequenz der V α 8.3- und V β 4-Kette des T-Zell-Rezeptors des C3-T-Zellklons	179
8.2	Sequenz-Vergleich der V α 8.3- und V β 4-Kette des C3-T-Zellklons mit der IMGT-Datenbank	181
8.3	Schematische Darstellung des pHSE3'-Expressionsvektors	182
8.4	Abkürzungen	183
9.	Curriculum vitae	187

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden drei T-Zell-Rezeptor (TZR) -transgene SJL/J-Mauslinien entwickelt, die eine unterschiedliche Penetranz MOG- (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) spezifischer T-Zellen in ihrem T-Zell-Repertoire aufweisen. Der transgene T-Zell-Rezeptor, der sich aus der V α 8.3- und V β 4-Kette zusammensetzte, wurde aus einem enzephalitogenen CD4⁺-T-Zellklon (C3) isoliert und war spezifisch für das im MHC-Klasse-II-Molekül (I-A^s) präsentierte MOG-Peptid, MOG₉₂₋₁₀₆.

Transgene Mäuse, die eine hohe Frequenz transgener T-Zellen in ihrem CD4⁺-T-Zell-Repertoire exprimierten (>80%), entwickelten in nahezu allen Weibchen und ca. 75% der Männchen spontane EAE (*RR-Maus*). Im Unterschied dazu konnte in Tieren mit einer mittleren Frequenz transgener T-Zellen (ca. 30%) in keinem Fall spontane EAE beobachtet werden, interessanterweise aber in einigen Mäusen mit einer geringen Penetranz (ca. 5%) transgener MOG-spezifischer T-Zellen.

Der klinische Verlauf der spontanen EAE war bei den Weibchen überwiegend schubförmig-remittierend (engl.: relapsing-remitting; *RR-Maus*), bei den Männchen folgte er teils auch einem progredienten Verlauf. Die histologische Analyse der *RR-Mäuse* zeigte, dass ganz unterschiedliche ZNS-Areale, darunter Cerebellum, Stammhirn, Rückenmark und optische Nerven, Ziel einer starken, von Entzündungsreaktionen begleiteten Demyelinisierung waren.

Interessanterweise konnten im Serum der *RR-Mäuse* MOG-spezifische Autoantikörper gefunden werden, die von rekrutierten und aktivierten B-Zellen des endogenen B-Zell-Repertoires gebildet wurden. Diese neu entdeckte Variante der Rekrutierung autoimmuner B-Zellen konnte weder in MOG-defizienten noch in EAE-resistenten Tieren gefunden werden und ist somit eine Folge (prä-)klinischer EAE-Läsionen, wodurch MOG seinen „immunprivilegierten“ Status verliert und für das Immunsystem zugänglich gemacht wird, so dass es zur Aktivierung MOG-spezifischer T- und B-Zellen kommen kann.

Aufgrund ihres spontanen, meist schubförmig-remittierenden Krankheitsverlaufs unter der Beteiligung unterschiedlichster ZNS-Areale sowie der *de novo* Synthese MOG-spezifischer Autoantikörper ist die *RR-Maus* ein neues viel versprechendes Krankheitsmodell für die „westliche Variante“ der Multiplen Sklerose.

2. *Einleitung*

Das Immunsystem (vom lateinischen *immunis* für „frei“, „verschont“ oder „unberührt“) ist ein komplexes Netzwerk aus Organen, Zelltypen und chemischen Molekülen, das die Aufgabe hat, den Körper vor Infektionen durch Pathogene zu verteidigen. Bei höheren Vertebraten lässt es sich in die zwei miteinander wechselwirkenden Systeme des angeborenen und des adaptiven Immunsystems gliedern.

Ersteres besteht aus entwicklungsgeschichtlich ursprünglicheren Zelltypen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen, sowie aus humoralen Effektormechanismen wie beispielsweise dem Komplementsystem.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind nicht spezialisiert, sie erkennen invariante Strukturen von Pathogenen, sogenannte PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular pattern), darunter die Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien oder doppelsträngige DNA aus Viren. Werden diese Moleküle von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt, führt dies zur sofortigen Aktivierung der Zellen, ohne dass sich dabei jedoch ein immunologisches Gedächtnis ausbilden kann. Die Zellen des angeborenen Immunsystems bilden die erste Defensive beim Eintritt eines Pathogens.

Gelingt es dem angeborenen Immunsystem nicht, eine voranschreitende Infektion einzudämmen, kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. B-Zellen und T-Zellen sowie die von B-Zellen sezernierten Antikörper bilden das adaptive Immunsystem. Im Unterschied zu den Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen sowohl T- als auch B-Zellen über hochspezifische Antigenrezeptoren, den B-Zell- und T-Zell-Rezeptor. Wird dieser spezifisch aktiviert, kommt es zur klonalen Expansion der entsprechenden Zelle (Burnett, 1959) sowie zur Differenzierung ihrer Nachkommen in unterschiedliche Effektorzelltypen.

Einige der spezifisch aktivierten Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen und bilden das sogenannte „memory“ (engl.: Gedächtnis), das bei einer Zweitinfektion mit demselben Pathogen zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort führt.

Kennzeichnend für das adaptive Immunsystem sind die hohe Spezifität und die damit verbundene hohe Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Antigene (Diversität) sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

2.1 T-Zell-Rezeptor und MHC

Das adaptive Immunsystem beruht auf der Bildung der hochvarianten Antigen-Rezeptoren von B- und T-Zellen.

B- und T-Zellen entstehen aus pluripotenten Vorläuferzellen, die im Knochenmark gebildet werden. Für ihre Reifung verbleiben B-Zellen im Knochenmark und exprimieren schließlich einen B-Zell-Rezeptor (BZR). Dieser enthält zwei identische Antigenbindungsstellen und erkennt Antigene als native, komplexe Epitope. Nach Aktivierung der jeweiligen B-Zelle wird der B-Zell-Rezeptor als lösliches Molekül, als Antikörper, sekretiert.

Die Vorläuferzellen der T-Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in den Thymus, wo sie heranreifen und den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) exprimieren. Im Gegensatz zum BZR hat der TZR nur eine Antigenbindungsstelle und erkennt Antigene als Peptide im Komplex mit körpereigenen Haupthistokompatibilitäts-Molekülen (MHC).

2.1.1 Der MHC

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex, MHC) ist ein großer Genkomplex, der beim Menschen auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 liegt. Bei der Maus umfasst er ca. 2000 kb mit mehr als 120 Genen (Allcock et al., 2000).

Der MHC wurde aufgrund seiner Fähigkeit entdeckt, in Inzuchtmäusen die Gewebeverträglichkeit bei der Transplantation zu vermitteln (Snell, 1948). Die Gene des MHC werden in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Während MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Gene für die klassischen Gewebeverträglichkeitsproteine, auch MHC-Moleküle genannt, kodieren, liegen im MHC-Klasse-III-Lokus andere, meist immunrelevante Gene, wie z.B. für die Komplementfaktoren C4 und C2 und die Zytokine TNF α und β .

Klassische MHC-Moleküle sind die Moleküle, die Peptide für $\alpha\beta$ -T-Zellen präsentieren. Alle klassischen MHC-Moleküle sind hochpolymorph. Bei Mensch und Maus gibt es je drei klassische MHC-I-Moleküle: beim Menschen HLA-A, -B und -C (Humane Leukozyten Antigene) und bei der Maus H-2K, H-2D bzw. H-2L.

Die MHC-Klasse-I-Moleküle sind Heterodimere, aufgebaut aus einer variablen α -Kette, die in der MHC-Klasse-I-Region kodiert ist, und dem nichtpolymorphen β 2-Mikroglobulin, das auf einem anderen Chromosom kodiert ist. Für die MHC-Moleküle der Maus wurden die

verschiedenen Allele nach dem Haplotyp der ersten Inzuchtlinien benannt, mit denen diese Allele serologisch definiert wurden. Da die Haplotypen mit H-2^a, H-2^b usw. benannt wurden, heißen die verschiedenen Allele eines MHC-I-Moleküls H-2K^b, H-2D^k usw.

MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere, die aus polymorphen α - und β -Ketten, die beide im MHC-Klasse-II-Lokus kodiert werden, zusammengesetzt sind. Beim Menschen gibt es drei Loci für klassische MHC-Klasse-II-Moleküle, HLA-DR, -DP und -DQ; bei der Maus gibt es hingegen nur zwei, die I-A und I-E genannt werden. Der genaue Aufbau der MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle ist in Abb. 2.1 dargestellt.

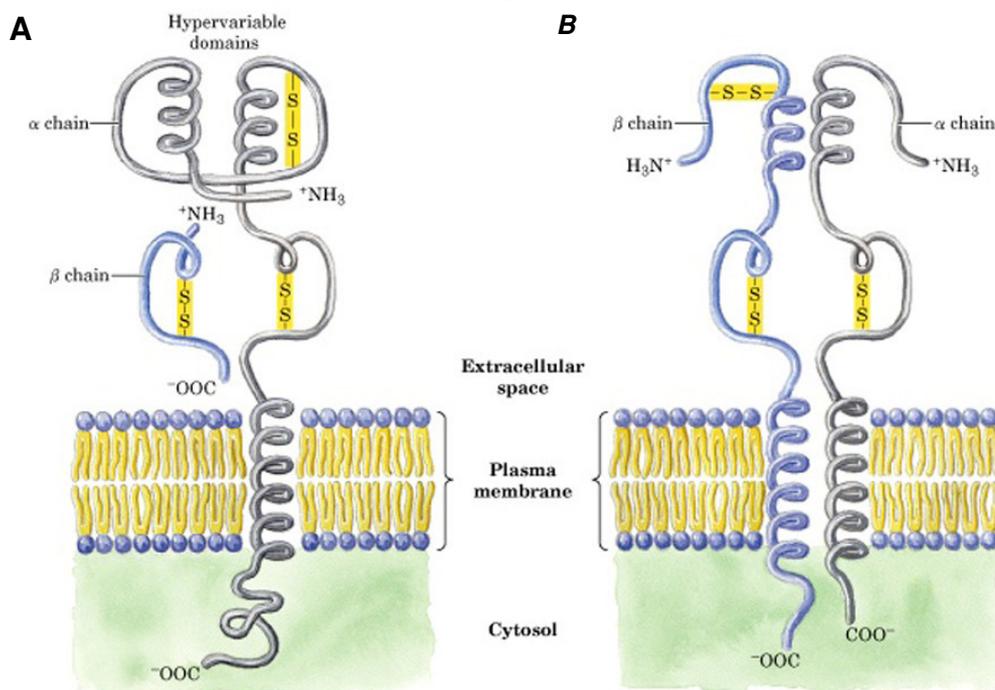


Abbildung 2.1:

Aufbau der MHC-Klasse-I- und -Klasse-II-Moleküle (Aus „courses.cm.utexas.edu ch7_MHC-proteins“)

(A) MHC-Klasse-I: Die MHC-Klasse-I-Moleküle sind Heterodimere, die aus einer variablen α -Kette und dem nicht polymorphen β 2-Mikroglobulin aufgebaut sind. Die Peptidbindungsgrube von MHC-I-Molekülen ist an beiden Enden stark verengt, daher binden sie vor allem kurze Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge. **(B) MHC-Klasse-II:** MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere, die aus polymorphen α - und β -Ketten zusammengesetzt sind. Die Peptide, die im MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert werden, haben eine variable Länge von 13-23 Aminosäuren.

MHC-Klasse-I-Moleküle werden ubiquitär auf fast allen Körperzellen exprimiert. Sie präsentieren in ihrer Peptidbindungsgrube präferentiell kurze Peptide von 8 bis 10 Aminosäuren Länge. Die präsentierten Peptide stammen überwiegend von intrazellulären Proteinen ab und sind somit entweder körpereigenen Ursprungs oder Bestandteile von intrazellulären Pathogenen, wie z.B. Viren. Die MHC-I-Peptid-Komplexe werden auf der Zelloberfläche CD8⁺-T-Zellen präsentiert.

MHC-Klasse-II-Moleküle werden im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen nur von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie B-Zellen, Makrophagen ($M\Phi$) und Dendritischen Zellen und einigen wenigen spezialisierten Zelltypen, wie z.B. Darm- und Thymusepithelzellen sowie manchen Endothelien, exprimiert. Darüber hinaus kann es durch die Wirkung von $IFN\gamma$ während einer Entzündung zur Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf weiteren Zelltypen kommen (Benoist und Mathis, 1990). Die Peptide, die im MHC-Klasse-II-Molekül präsentiert werden, haben eine variabelere Länge, nämlich von 13-23 Aminosäuren, als jene von Klasse-I-Molekülen, da sie sowohl am N- als auch am C-Terminus aus der Peptidbindungsgrube herausragen können (Urban et al., 1993). Die Bindung der Peptide an das MHC-Klasse-II-Molekül erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindungen konservierter Asparaginreste der α -Helices der Bindungsgrube zu Carbonyl- und Amidgruppen des Peptid-Rückgrades, also sequenzunabhängig. Zudem gibt es spezielle Ankerreste des Peptides zum MHC-Klasse-II-Molekül, welche die Bindung entscheidend beeinflussen können.

Die Peptide, die in MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, stammen meist von exogenen extrazellulären, sekretierten oder membranständigen Proteinen ab. Der Grund hierfür ist, dass die Beladung der MHC-Klasse-II- im Unterschied zu MHC-Klasse-I-Molekülen nicht im Endoplasmatischen Retikulum erfolgt, sondern in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten. Die in MHC-Klasse-II-Molekülen gebundenen Peptide werden an der Zelloberfläche $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert.

2.1.2 Der T-Zell-Rezeptor

2.1.2.1 Die Somatische Rekombination der T-Zell-Rezeptor-Gene

Die meisten T-Zellen exprimieren einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, der sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Der $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor bindet an antigene Peptide, die in MHC-Molekülen präsentiert werden.

Ein kleinerer Anteil der T-Zellen eines Organismus besitzt einen T-Zell-Rezeptor, der sich aus einer γ - und einer δ -Kette zusammensetzt. $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren binden direkt an Glykoproteine von Pathogen oder an sogenannte „nichtklassische“ MHC-Moleküle (Adams et al., 2005; Chien et al., 1996).

Wie der B-Zell-Rezeptor bei B-Zellen verfügt jede $\alpha\beta$ -T-Zelle über einen individuellen T-Zell-Rezeptor, der sich aus unterschiedlichen polygenen Untereinheiten zusammensetzt. Die Gene für die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors bestehen aus getrennten Gensegmenten (siehe Abb. 2.2), die während der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination miteinander verknüpft werden.

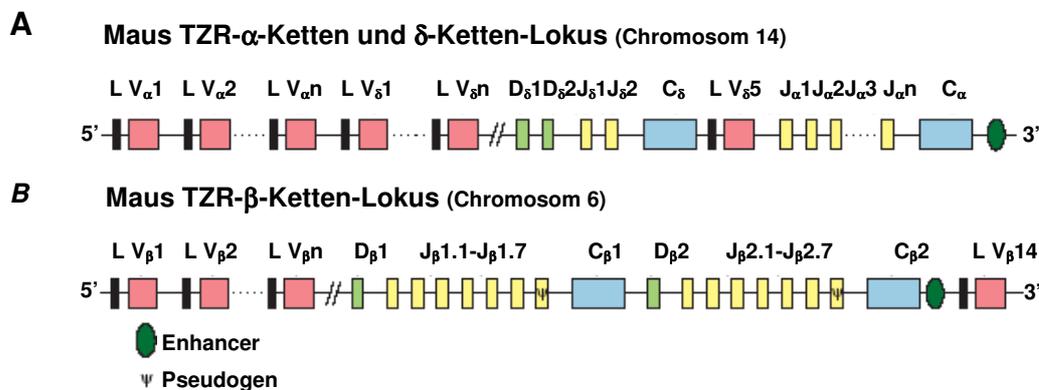


Abbildung 2.2:

Keimbahnorganisation der T-Zell-Rezeptor α -, β - und δ -Gensegmente bei der Maus (Aus Kuby 5. und der IMGT-Datenbank)

(A) Der T-Zell-Rezeptor α -Lokus der Maus ist auf Chromosom 14C1 bei 19,7 cM lokalisiert. Der α -Lokus umfasst 1,650 kb und beinhaltet von 5' nach 3' 98 V $_{\alpha}$ -Gene, die in zwei Clustern stromaufwärts der 60 J $_{\alpha}$ -Gene und eines C $_{\alpha}$ -Gens organisiert sind. Die Gene für die δ -Kette sind zwischen den V $_{\alpha}$ - und J $_{\alpha}$ -Genen lokalisiert (Lefranc et al., 2005).

(B) Der T-Zell-Rezeptor β -Lokus der Maus ist auf Chromosom 6B2 bei 20,5 cM lokalisiert. Der β -Lokus umfasst 700 kb und beinhaltet von 5' nach 3' 35 V $_{\beta}$ -Gene. Mit Ausnahme von V $_{\beta}14$, welches sich stromabwärts des C $_{\beta}2$ -Gens befindetet, sind alle V $_{\beta}$ -Gene stromaufwärts eines duplizierten [1D $_{\beta}$ -7J $_{\beta}$ -1C $_{\beta}$]-Genclusters organisiert. Jedes C $_{\beta}$ -Gensegment setzt sich aus einer Reihe von Exons und Introns zusammen, die hier nicht dargestellt sind. L. (engl.: leader)

Für die Entstehung einer α -Kette gelangt zunächst ein V $_{\alpha}$ - (variabel) neben ein J $_{\alpha}$ - (engl.: j α oining) Gensegment und es entsteht ein funktionelles Exon. Transkription und Spleißen des

VJ α -Exons an C α (engl.: constant) bilden anschließend die mRNA, die zum α -Kettenprotein des TZR translatiert wird.

Die β -Kette ist, wie die schwere Kette der Immunglobuline, in 4 Gensegmenten V β , D β (engl.: diversity), J β und C β kodiert. Zunächst schafft die Umordnung der V β -, D β - und J β -Gensegmente ein funktionelles V β -D β -J β -Exon, das transkribiert und anschließend an C β gespleißt wird. Die entstandene mRNA wird zum β -Kettenprotein translatiert. Die α - und β -Kette verbinden sich nach ihrer Synthese zum $\alpha\beta$ -TZR-Heterodimer.

Nachfolgende Tabellen geben einen Überblick über die Anzahl an V-, (D-), J- und C-Gensegmenten, die für den Zusammenbau der α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors verwendet werden können.

A	α-Kette	gesamt	funktional
	Vα	98	73-84
	Jα	60	38
	Cα	1	1
	α total	159	112-123

B	β-Kette	gesamt	funktional
	Vβ	35	21-22
	Dβ	2	2
	Jβ	14	11
	Cβ	2	2
	β total	53	36-37

Tabelle 2.3: Anzahl an V-, (D-), J- und C-Gensegmenten, die für den Zusammenbau der α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors theoretisch verwendet werden können

(A) Die Gesamtzahl der T-Zell-Rezeptor α -Gene beträgt pro haploidem Genomsatz 159, wovon 112 bis 123 Gene funktionell sind. **(B)** Die Gesamtzahl der T-Zell-Rezeptor β -Gene beträgt pro haploidem Genomsatz 53, wovon 36 bis 37 funktionell sind.

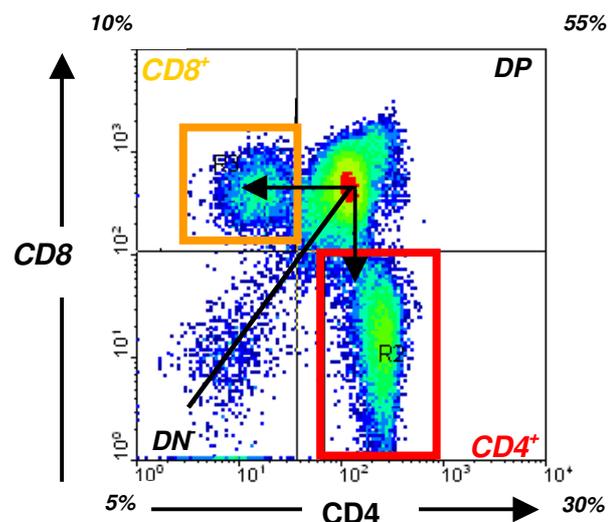
Durch die kombinatorische Verwendung verschiedener Gensegmente zum einen sowie das Einführen von P- und N-Nukleotiden in den Verbindungsstellen zum anderen ist theoretisch eine Gesamtvielfalt des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-Repertoires von ca. 10^{16} möglich (Davis und Bjorkman, 1988; Tonegawa et al., 1983). Diese hohe Diversität der adaptiven Immunantwort ermöglicht es, potenziell alle molekularen Strukturen zu erkennen. Aus genau diesem Grund müssen B- und T-Zellen während ihrer Entstehung die Toleranz für körpereigene Strukturen „erlernen“, damit es nicht zur Ausbildung autoreaktiver Zellen und damit zur Autoimmunität kommt.

2.1.2.2 Die T-Zell-Reifung

T-Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen der fötalen Leber bzw. bei Erwachsenen des Knochenmarks ab. Vorläufer-T-Zellen, die weder einen T-Zell-Rezeptor noch einen CD4- oder CD8-Corezeptor exprimieren, wandern in den Thymus. Im Thymuskortex beginnen diese Zellen mit der Rekombination der TZR- β -Kette. Die T-Zellen, die im Begriff sind, die β -Kette zu rekombinieren, werden als Pro-T-Zellen bezeichnet und befinden sich im sogenannten doppelt-negativen $CD4^-CD8^-$ -Stadium (Abbas et al., 2000). Die erfolgreich rekombinierte β -Kette wird zusammen mit einer Ersatz- α -Kette (prä-T α) im Komplex mit CD3 an die Zelloberfläche transportiert. Die Expression dieses prä-T α -TZR β -Komplexes führt zu einer Inhibition einer weiteren Rekombination des TZR- β -Lokus auf beiden Chromosomen (allele Exklusion), zum anderen werden die Zellen zur Proliferation angeregt und es kommt zur Expression der Corezeptoren CD4 und CD8. In diesem Stadium werden die Thymozyten als doppelt-positive $CD4^+CD8^+$ -T-Zellen bezeichnet. Nun beginnt die Rekombination der TZR- α -Kette, die nach erfolgreicher Rekombination zusammen mit der TZR- β -Kette auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Da es für die TZR- α -Kette keine allele Exklusion gibt, kann es so lange zu weiteren Rekombinationen der α -Kette kommen, bis die Zelle positiv selektioniert wird. Dies führt dazu, dass ca. 30% der peripheren T-Zellen zwei unterschiedliche TZR- α -Ketten auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Padovan et al., 1993). In Abbildung 2.4 ist die Thymozytenreifung anhand einer FACS-Färbung der CD4- und CD8-Corezeptoren dargestellt.

Abbildung 2.4:
Thymozytenreifung dargestellt anhand einer FACS-Färbung der CD4- und CD8-Corezeptoren

Die Reifung der Thymozyten erfolgt entlang der Pfeile von doppelt-negativen $CD4^-CD8^-$ (DN)- zu doppelt-positiven $CD4^+CD8^+$ (DP)-Zellen und schließlich zu $CD4^+$ - oder $CD8^+$ - einfach-positiven T-Zellen (SP). Nur ca. 10% der DN-Zellen exprimieren bereits einen $\alpha\beta$ -TZR; 10% exprimieren einen $\gamma\delta$ -TZR. Die Hälfte der DP-Population ist TZR $^+$, die andere Hälfte TZR $^-$. Alle SP-Thymozyten sind TZR $^+$. Die positive Selektion erfolgt im doppelt-positiven Stadium, die negative Selektion erfolgt während und nach dem doppelt-positiven Stadium.



Die meisten (95%) der doppelt-positiven Thymozyten, die alle nur geringe Mengen der TZR-Ketten exprimieren, sind zur Apoptose verurteilt (Huessmann et al., 1991). Dabei handelt es

sich um Zellen, die T-Zell-Rezeptoren tragen, welche keine Selbst-MHC-Moleküle erkennen und somit keine positive Selektion erfahren können (Zinkernagel et al., 1974). Dagegen reifen jene doppelt-positiven Zellen heran, die Selbst-MHC-Moleküle erkennen, und beginnen eine starke Expression der T-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Die positive Selektion der Thymozyten findet im Kortex des Thymus und an der Grenze zur Medulla statt und wird mit Hilfe kortikaler Thymus-Epithelzellen durchgeführt. Anschließend beenden die Thymozyten die Expression eines der beiden Corezeptormoleküle und werden entweder zu einfach-positiven CD4⁺- oder CD8⁺-Thymozyten.

Während und nach dem doppelt-positiven Stadium ihrer Entwicklung durchlaufen die T-Zellen die sogenannte negative Selektion. Hierbei werden alle Zellen aus dem Repertoire entfernt, deren T-Zell-Rezeptoren eine zu starke Affinität zum eigenen MHC mit gebundenem Selbstpeptid haben. So wird verhindert, dass es zur Ausbildung autoreaktiver T-Zellen kommt (Klonale Deletion, Burnet 1959, Kappler et al., 1987). Nach van Meerwijk et al., (1997) wird ca. die Hälfte der positiv selektionierten Thymozyten durch die negative Selektion deletiert. Die negative Selektion findet an der Grenze zur Medulla und in der Medulla selbst statt und wird mit Hilfe sogenannter thymischer Dendritischer Zellen und mTECs (engl.: medullary thymic epithelial cells) durchgeführt (Brocker et al., 1997; Volkman et al., 1997). Die Antigene, die in der negativen Selektion hauptsächlich präsentiert werden, sind Antigene, die im Thymus selbst produziert werden, und solche aus der Zirkulation (Kyewski et al., 1984; Zal et al., 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es in den thymischen Epithelzellen zur ektopischen Expression gewebsspezifischer Antigene kommen und so das Überleben der für diese Antigene spezifischen potentiell autoaggressiven T-Zellen verhindert werden kann (Hanahan, 1998; Klein et al., 1998; Anderson et al., 2002).

Neben der klonalen Deletion gibt es weitere Mechanismen, darunter die Ausbildung von Anergie (Schönrich et al., 1992), Rezeptor-Editing (McGargill et al., 2000), T-Zell-Rezeptor-Revision (Fink et al., 2003) und außerdem die Kontrollinstanz der regulatorischen T-Zellen, T_{Regs} (Sakaguchi, 2000; Seddon und Mason, 2000), um autoreaktive T-Zellen in Schach zu halten. Diejenigen Zellen, die sowohl positive als auch negative Selektion überlebt haben, reifen zu einfach-positiven T-Zellen heran, verlassen den Thymus und werden Teil des peripheren T-Zell-Repertoires.

2.1.2.3 Aufbau und Signalgebung des TZR:CD3-Komplexes

Das fertig zusammengebaute T-Zell-Rezeptor-Heterodimer (siehe Abb. 2.5) besteht aus den zwei Transmembran-Glykoproteinketten α und β . Der äußere Teil jeder Kette besteht aus zwei Domänen, die den variablen bzw. konstanten Domänen der Immunglobuline ähneln. Die zuvor beschriebenen V-, (D-) und J-Gensegmente bilden die variable Domäne, das C-Gensegment entsprechend die konstante Domäne des T-Zell-Rezeptors. Ein kurzes Segment jeder Kette, das Gelenk, verbindet die immunglobulinartigen Domänen (Ig-Domäne) mit der Zellmembran und enthält das Cystein, das an der Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den beiden Ketten beteiligt ist.

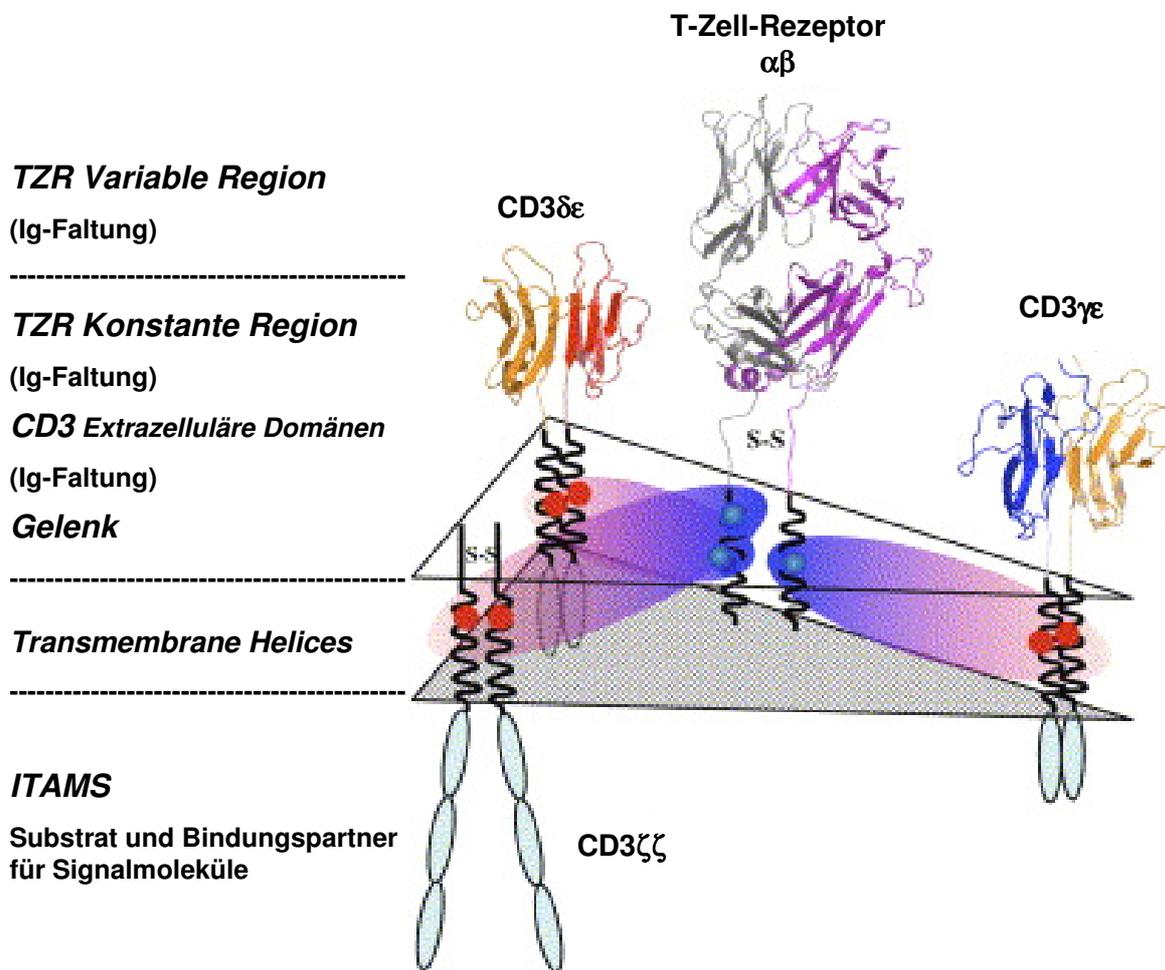


Abbildung 2.5:

T-Zell-Rezeptor:CD3-Komplex (Entnommen und abgeändert aus Garcia et al., 2006)

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, die je aus zwei immunglobulinartigen Domänen (Ig-Domäne) aufgebaut sind. CD3 γ -, δ - und ϵ -Moleküle haben je eine extrazelluläre Ig-Domäne. Die transmembranären Helices der TZR-Ketten enthalten positiv geladene (basische) Reste (blaue Kugeln). Die α -Kette besitzt zwei solcher Reste, die β -Kette einen. Ein positiv geladener Rest der α -Kette interagiert mit einem negativ geladenen, sauren As-Rest in der transmembranären Helix des CD3 $\delta\epsilon$ -Heterodimers (rote Kugeln), der andere mit einem entsprechenden sauren Rest im CD3 $\zeta\zeta$ -Homodimer. Der basische Rest der β -Kette interagiert ebenso mit einem negativ geladenen, sauren As-Rest des CD3 $\gamma\epsilon$ -Heterodimers. Die elektrostatischen Interaktionen zwischen zwei sauren und einem basischen Rest in den transmembranären Helices des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors und den CD3-Ketten ist als rot/blau markiertes Oval dargestellt.

Die Oberflächenexpression des T-Zell-Rezeptors erfolgt nur zusammen mit den CD3 $\gamma\epsilon$ -, CD3 $\delta\epsilon$ - und CD3 $\zeta\zeta$ -Signaluntereinheiten (Samelson et al., 1985, Wegener et al., 1995). Die extrazelluläre Domäne der CD3 $\delta\epsilon$ - und CD3 $\gamma\epsilon$ -Heterodimere besteht aus nebeneinander gepaarten Ig-Domänen. Das CD3 $\zeta\zeta$ -Homodimer hat nur einen sehr kurzen extrazellulären Bereich von 9 Aminosäuren Länge und ist von unbekannter Struktur (Arnett et al., 2004; Kjier-Nielsen et al., 2004; Sun et al., 2001).

Hochkonservierte geladene Aminosäurereste in den transmembranen Helices sind für die Interaktion des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors mit den CD3-Molekülen verantwortlich. Die intrazellulären Domänen jeder CD3-Kette verfügen über sogenannte ITAMs (engl.: immunreceptor tyrosine-based activation motif). Diese ITAMs dienen als Substrat und Bindungspartner für die intrazelluläre Signaltransduktions-Maschinerie, die nach einer erfolgreichen Stimulation des T-Zell-Rezeptors in Kraft tritt (Kane et al., 2000). Die CD3 $\delta\gamma$ - und ϵ -Ketten haben je ein ITAM, die CD3 ζ -Kette verfügt über 3 ITAMs.

Die Bindung eines Peptid-MHC-II-Komplexes an den TZR:CD3-Komplex sowie an den CD4-Corezeptor führt zur Aggregation von CD4, dem TZR:CD3-Komplex und CD45 (Grakoui et al., 1999). Sowohl der TZR:CD3-Komplex als auch der CD4-Corezeptor sind mit zytosomatischen Tyrosinkinasen, Fyn und Lck, assoziiert. Die räumliche Nähe der Tyrosinphosphatase CD45 zu CD4 und dem TZR:CD3-Komplex nach erfolgter Bindung des Peptid-MHC-II-Komplexes ermöglicht es, inhibitorische Phosphatgruppen auf den Tyrosinkinasen Fyn und Lck zu entfernen und diese dadurch zu aktivieren. Eine Folge dieser Aktivierung ist die Phosphorylierung der CD3 ζ -Kette, die anschließend an die zytosolische Tyrosinkinase, ZAP-70 (ζ -assoziertes Protein-70) binden und diese aktivieren kann. Es folgt die Aktivierung der Phospholipase C- γ , die das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) spaltet. DAG bewirkt in der Zelle die Aktivierung der Proteinkinase C, einer Serin/Threonin-Kinase, was letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B führt. IP₃ verursacht unterdessen die Freisetzung von Kalziumionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern bzw. den Einstrom extrazellulären Ca²⁺ durch Öffnen Ca²⁺-spezifischer Kanäle in der T-Zell-Membran. Die daraus resultierende erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt zur Aktivierung von Calcineurin, einer zytosomatischen Phosphatase, die daraufhin den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NFAT (engl.: nuclear factor of activated T cells) aktiviert. Für die vollständige Aktivierung von NFAT ist jedoch außerdem der Transkriptionsfaktor AP-1, ein Heterodimer bestehend aus Jun und Fos, erforderlich.

Ein weiterer Signalweg, der durch das aktivierte ZAP-70 ausgelöst wird, ist die Aktivierung von Ras, was nach einer Kaskade aktivierter Kinasen schließlich zur Aktivierung des Fos-Proteins und damit der AP-1-Transkriptionsfaktoren führt. Gemeinsam bewirken die Transkriptionsfaktoren NF κ B, NFAT und AP-1 die Transkription neuer Gene, was schließlich zur Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt.

2.1.2.4 Ausbildung von T-Effektorzellen

Naive einzelpositive T-Zellen in der Peripherie exprimieren den Lymphozyten-homing-Rezeptor L-Selektin (CD62L). Dieser ermöglicht den T-Zellen die Extravasation aus der Blutbahn in die Lymphknoten (Butcher und Picker, 1996; Campbell und Butcher, 2000). Begegnet eine T-Zelle im Lymphknoten einer aktivierten Dendritischen Zelle (DC), die Peptid-MHC-Komplexe präsentiert, für welche der T-Zell-Rezeptor der T-Zelle spezifisch ist, kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle. Aktivierte $CD4^+$ -T-Zellen können je nach Stimulus unter Verwendung spezifischer Transkriptionsfaktoren in T_H1 -, T_H2 - oder T_H17 -Effektorzellen mit unterschiedlichen Aufgabengebieten differenzieren (siehe Abb. 2.6).

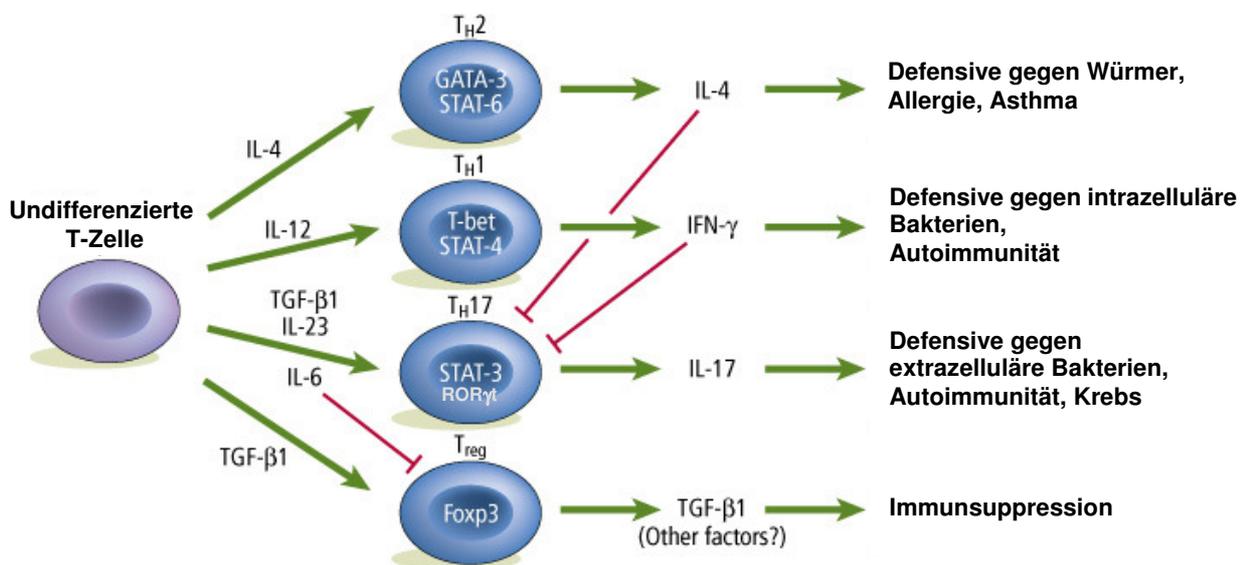


Abbildung 2.6:

Differenzierung zu $CD4^+$ -T-Effektorzellen (entnommen aus www.bidmc.harvard.edu)

Für die Differenzierung zu **T_H2 -Zellen** werden die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und STAT-6 über eine Signaltransduktions-Kaskade aktiviert, die von IL-4 ausgelöst wurde. T_H2 -Zellen produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und stellen die Immunabwehr gegen Würmer dar bzw. sind beteiligt an Allergien und Asthma. **T_H1 -Zellen** werden in Anwesenheit von IL-12 mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren STAT4 und T-bet generiert. Sie produzieren $IFN\gamma$ und IL-2 und spielen bei der Abwehr intrazellulärer Bakterien sowie bei Autoimmunität eine Rolle. **T_H17 -Zellen** entstehen mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren STAT3 und ROR γt . Sie sezernieren die Zytokine IL-17A und IL-17E sowie $TNF\alpha$ und IL-6. Die Ausbildung von T_H17 -Zellen wird sowohl von IL-4 als auch $IFN\gamma$ inhibiert. IL-23 wird für die Aufrechterhaltung und Expansion der T_H17 -Zellen benötigt. In Abwesenheit von IL-6 kann TGF $\beta 1$ die Induktion des Transkriptionsfaktors Foxp3 und damit die Entwicklung regulatorischer T-Zellen, T_{regs} , induzieren. Regulatorische T-Zellen haben die Aufgabe, Immunreaktionen unter Kontrolle zu halten.

Ist IL-12 während der Aktivierung einer naiven $CD4^+$ -T-Zelle vorhanden, kommt es zu ihrer Differenzierung in T_H1 -Zellen. T_H1 -Zellen sezernieren die Zytokine $IFN\gamma$ und IL-2. Hat sich im Mikromilieu der Aktivierung hingegen IL-4 angesammelt, so differenziert die $CD4^+$ -T-

Zelle zu T_H2-Effektorzellen, die wiederum die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Entsprechend führt die Anwesenheit von IL-6 und TGFβ während der Aktivierung einer CD4⁺-T-Zelle dazu, dass sich sogenannte T_H17-Effektorzellen ausbilden. T_H17-Zellen produzieren und sezernieren die Zytokine IL-17A und IL-17E, TNFα, IL-1 sowie IL-6 (Furuzawa-Carballeda et al., 2007). Die Zytokine IL4 und IFNγ wirken antagonistisch aufeinander, und gemeinsam hemmen sie die Ausbildung von T_H17-Effektorzellen. So verhindert jede T_H-Zell-Subpopulation die Expansion der anderen (Romagnani, 1997; Bettelli et al., 2006). Aktivierte T-Zellen haben eine niedrige Expression von CD62L und exprimieren sogenannte Aktivierungsmarker wie z.B. CD44, LFA-1 und VLA-4, die es den T-Effektorzellen ermöglichen, das Lymphgewebe zu verlassen und in peripheres Gewebe einzuwandern.

Die Affinität des T-Zell-Rezeptors zum MHC-Peptid-Komplex ist relativ niedrig und die Bindung deshalb sehr instabil. Dies führt dazu, dass die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Peptid-Komplex nur wenige Sekunden andauert (Corr et al., 1994; Lyons et al., 1996). Zudem sind jeweils nur wenige MHC-Moleküle einer APC mit dem für den TZR spezifischen Peptid besetzt. Daher muss eine T-Zelle wahrscheinlich die APC „abscannen“ und es kommt zu einer seriellen Aktivierung vieler unterschiedlicher T-Zell-Rezeptoren einer T-Zelle mit ein und demselben MHC-Peptid-Komplex (Valitutti und Lanzavecchia, 1997; Viola und Lanzavecchia, 1996). Dadurch sind ca. 50-100 spezifische Peptid-MHC-Komplexe auf einer APC ausreichend, um eine T-Zelle zu aktivieren (Demotz et al., 1990; Harding und Unanue, 1990).

2.2 Autoimmunität

Unter Autoimmunität versteht man adaptive Immunreaktionen gegen körpereigene Gewebsantigene in der (diagnostischen) Abwesenheit von Infektionen. Autoimmunreaktionen sind eine natürliche Folge des uneingeschränkten Repertoires an B- und T-Zell-Rezeptoren, welches es diesen Zelltypen erlaubt, potentiell alle Strukturen zu erkennen.

Weltweit leiden ca. 5% der Bevölkerung an Autoimmunerkrankungen, wobei epidemiologische Studien belegen, dass sie vor allem in den Industrienationen auf dem Vormarsch sind (Davidson und Diamons, 2001; Jacobson et al., 1997). Obwohl der Pathomechanismus vieler Autoimmunerkrankungen noch nicht vollständig geklärt ist, nimmt man an, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Welche Bedeutung infektiöse Organismen im Zusammenhang mit Autoimmunität spielen, ist nicht genau geklärt. Einerseits besagt die sogenannte „Hygiene-Hypothese“, dass es in Abwesenheit von infektiösen Organismen zum verstärkten Auftreten von Autoimmunerkrankungen kommen kann (Strachan, 2000). Andererseits kann in manchen Fällen die Anwesenheit infektiöser Agentien auch eine Autoimmunreaktion hervorrufen (Bach et al., 2002; Christen und von Herrath, 2005).

Autoimmunerkrankungen werden je nach betroffenem Organ oder Gewebe in organspezifische Erkrankungen, wie Multiple Sklerose (MS) und Insulin-abhängige Diabetis Mellitus (engl.: IDDM, *insulin dependant diabetes mellitus*), oder in systemische Erkrankungen, wie im Fall von Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) und Rheumatoide Arthritis (RA), eingeteilt. Die zugrunde liegenden Immunmechanismen können dabei eher Antikörper-basiert sein, wie im Fall von SLE, oder mehr auf der Aktivität autoreaktiver T-Zellen beruhen, wie z.B. bei MS und zum Teil auch der Rheumatoiden Arthritis.

Im Folgenden wird zuerst die Multiple Sklerose beim Menschen beschrieben, anschließend auf ihr Tiermodell, die *Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis*, eingegangen und schließlich werden immunologische Pathomechanismen aufgezeigt, die beiden Krankheiten zugrunde liegen.

2.2.1 Multiple Sklerose

2.2.1.1 Einführung zur Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose, auch „Encephalomyelitis disseminata“ genannt (Charcot, 1868), ist eine entzündliche, demyelinisierende und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems und stellt nach der Epilepsie die zweithäufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener dar. Weltweit sind mehr als eine Million Menschen allein in den Industrienationen davon betroffen, wobei die Erkrankung bei Frauen häufiger auftritt als bei Männern (ca. 1,6:1). Die ersten Symptome treten meist bei jungen Menschen zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auf.

In der äquatorialen Zone gibt es weniger Multiple Sklerose (MS)-Erkrankungen, als in den nördlichen bzw. südlichen Breiten. In epidemiologischen Studien wurde die Erkrankungshäufigkeit von Menschen, die aus MS-reichen Zonen in MS-arme Zonen übergesiedelt sind, z.B. von Europa nach Südafrika oder von Amerika nach Israel, untersucht. Es zeigte sich, dass Menschen, die vor ihrem 15. Lebensjahr übersiedeln, die Krankheitshäufigkeit des Ziellandes übernehmen, wohingegen Menschen, die nach dem 15. Lebensjahr übersiedeln, die Krankheitshäufigkeit ihres Herkunftslandes behalten (Dean und Kurtzke, 1971). So besteht die Möglichkeit, dass die Krankheitsanlage zur MS bereits vor dem 15. Lebensjahr vorhanden ist, auch wenn sich die Krankheit selbst erst viel später manifestiert.

Klinisch zeichnet sich die Multiple Sklerose durch zwei wesentliche Merkmale aus. Zum einen treten im Gehirn und teilweise auch im Rückenmark verstreut Entzündungen auf, die der Angriff körpereigener Immunzellen auf die Myelinscheiden der Nerven verursacht. Zum anderen kommt es zu einer zellulären Schädigung der Axone. Diese pathologischen Entwicklungen vermindern im Krankheitsverlauf die Leitfähigkeit der Nervenbahnen, was die typischen Symptome wie Sensibilitätsstörungen, Spastiken, Lähmungserscheinungen, schnelle Ermüdbarkeit (Fatigue) sowie Sehstörungen und Schwindelgefühle auslöst (Sospedra und Martin, 2005). So variabel wie der Ort der Läsionen im ZNS sein kann, so verschieden können auch der klinische Verlauf, das Ausmaß und die Symptomatik der Multiplen Sklerose sein.

2.2.1.2 Die Rolle genetischer Faktoren in der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose ist keine klassische Erbkrankheit, vielmehr vermutet man eine Kombination von genetischer Prädisposition, ethnischem Hintergrund und äußeren (Umwelt-) Faktoren. Dennoch belegten bereits frühe Zwillingsstudien von Mackay und Myriantopoulos (1966), dass das Erkrankungsrisiko bei eineiigen Zwillingen (ca. 35%) gegenüber Geschwistern (ca. 4%) bzw. gegenüber der Gesamtpopulation (ca. 0.2%) deutlich erhöht ist (Dyment et al., 2004).

Bei den Erbfaktoren der MS handelt es sich um polygene Merkmale, d.h., dass erst mehrere sogenannte Risikofaktoren zusammen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bedeuten, allen voran der MHC- oder HLA-Komplex (Humane Leukozyten Antigen). Genetische Kopplungsanalysen zeigten, dass es eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von Multipler Sklerose und den HLA-Klasse-II-Allelen HLA-DRB1*1501, HLA-DQA1*0102 und HLA-DQB1*0602 gibt (Olerup und Hillert, 1991). Eine Möglichkeit, wie bestimmte HLA-Allele das Erkrankungsrisiko für eine Autoimmunerkrankung erhöhen könnten, ist z.B. über die präferentielle Präsentation bestimmter Antigene oder über das Fehlen einer negativen Selektion bei der Entwicklung der autoreaktiven T-Zellen. Darüber hinaus zeigten genomweite Analysen von MS-Familien, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Multipler Sklerose und bestimmten Allelen von Genen gibt, die für TZR- β -Ketten oder Signaltransduktions-Moleküle (z.B. CTLA-4) kodieren (Dyment et al., 2004).

Dass auch Hormone eine mögliche Rolle als Risikofaktoren für das Auftreten von MS spielen, wird durch mehrere Tatsachen gestützt. Zum einen sind Frauen häufiger von der Krankheit betroffen als Männer (ca. 1,6:1), zum anderen erleben betroffene Frauen während einer Schwangerschaft meist eine deutliche Verbesserung ihres Krankheitsstatus, der sich allerdings mit dem veränderten Hormonhaushalt nach der Geburt des Kindes wieder deutlich verschlechtert (Vukusic und Confavreux, 2006). Auch in magnetresonanz-tomographischen (MRI) Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen einem hohen Östrogen- bzw. geringen Progesterongehalt und einer erhöhten Krankheitsaktivität festgestellt werden.

2.2.1.3 Bedeutung von Umweltfaktoren

Zu den möglichen (Umwelt-)Faktoren, die zum Auftreten von Multipler Sklerose beitragen können, werden sowohl Infektionserreger wie Bakterien und Viren als auch unterschiedliche Lebens- und Ernährungsbedingungen gezählt (Coo und Aronson, 2004).

Mehrere epidemiologische Studien, die Diskonkordanz im Auftreten von MS bei Zwillingen sowie der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor der meisten Patienten legen nahe, dass Infektionserreger, möglicherweise viraler Natur, als Verursacher der Multiplen Sklerose in Frage kommen könnten (Gilden, 2005). Retroviren und Herpesviren, darunter sowohl der Humane Herpesvirus 6, HHV-6, als auch das Epstein-Barr Virus, EBV, werden als mögliche Kandidaten für „virale Auslöser“ der Multiplen Sklerose in Betracht gezogen. Soldan et al. (1997) konnten in aktiven Läsionen von MS-Patienten die Humanen Herpesviren HHV-6 und HHV-8 nachweisen. Darüber hinaus gelang es vor kurzem, eine Kreuzreaktivität von IgG-Antikörpern aus dem Liquor cerebrospinalis und Serum von MS-Patienten mit zwei EBV-Proteinen, BRRF2 und EBNA-1, festzustellen (Cepok et al., 2005). Da die Durchseuchung der Population mit diesen Erregern aber relativ hoch ist, ist eine spezifische Korrelation dieser Viren mit dem Auftreten von Multipler Sklerose sehr erschwert.

Theoretisch gibt es mehrere Mechanismen, wie es im Zusammenhang mit einer Infektion zum Auftreten einer Autoimmunreaktion kommen kann. Einer davon ist die sogenannte „Molekulare Mimikry“ (Oldstone, 2005), bei der Moleküle verschiedener Natur die gleiche Struktur aufweisen und es so zur Kreuzreaktivität kommen kann. Im Fall der Multiplen Sklerose würde dies eine Kreuzreaktivität zwischen z.B. einem viralen Antigen und Autoantigenen des ZNS bedeuten, so dass es zur Aktivierung autoaggressiver T- und B-Zellen kommt. Tatsächlich konnten für die viralen Antigene HBV-P (von Hepatitis B Virus) sowie HSV-Terminase (aus Herpes Simplex Virus) und das ZNS-spezifische Protein MBP zum einen eine Sequenzhomologie, zum anderen ein gemeinsames strukturelles Motiv identifiziert werden, was in beiden Fällen zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führte (Fujinami und Oldstone, 1985; Wucherpfennig und Strominger, 1995).

Anders als bei der „Molekularen Mimikry“ kommt es beim Auftreten einer sogenannten „Bystander Aktivierung“ zu einer unspezifischen Aktivierung autoreaktiver Zellen aufgrund starker inflammatorischer Signale, wie z.B. der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren und der Ausschüttung von Zytokinen.

2.2.1.4 Klinischer Verlauf der Multiplen Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose wird zwischen mehreren Verlaufsformen unterschieden, wobei mit über 80% der sogenannte schubförmig-remittierende Verlauf dominiert, der in zwei Varianten, schubförmig-remittierend und schubförmig-remittierend mit sekundär-progredientem Verlauf, auftritt.

1.) Schubförmig-remittierender Verlauf

Die schubförmige oder auch rezidivierend-remittierende MS tritt mit einer Häufigkeit von ca. 40% auf. Es kommt zu Schüben mit plötzlichen Verschlechterungen, die sich entweder vollständig zurückbilden (siehe Abb. 2.7 A) oder teilweise bestehen bleiben (siehe Abb. 2.7 B). Bei ca. $\frac{3}{4}$ der Betroffenen kommt es innerhalb von 5 Jahren zu einem zweiten Schub. Anfangs gehen die Beschwerden zwischen den Schüben vollständig zurück, im weiteren Krankheitsverlauf bleiben leichte Behinderungen, da sich die Symptome nur noch teilweise zurückbilden.

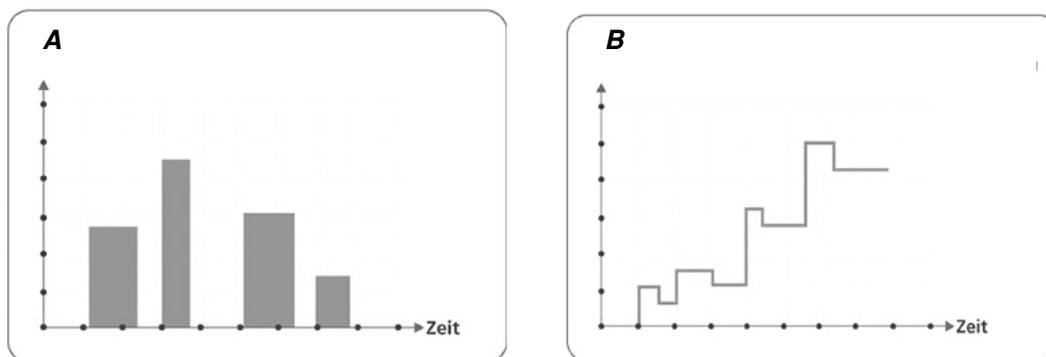


Abbildung 2.7:

Schubförmig-remittierender Verlauf der Multiplen Sklerose (aus www.leben-mit-MS.de)

Es kommt zu Schüben mit plötzlichen Verschlechterungen, die sich entweder vollständig zurückbilden (**A**) oder teilweise bestehen bleiben (**B**). Bei ca. $\frac{3}{4}$ der Betroffenen kommt es innerhalb von 5 Jahren zu einem zweiten Schub. Die Y-Achse gibt den Schweregrad der Erkrankung wieder.

2.) Schubförmig-remittierend mit sekundär-progredientem Verlauf

Die sekundär-fortschreitende oder sekundär-progrediente Multiple Sklerose tritt ebenfalls mit einer Häufigkeit von 40% auf. Hierbei entwickeln Patienten mit zu Beginn schubförmiger MS innerhalb von 10–15 Jahren eine chronisch-fortschreitende MS. Abbildung 2.8 (**A**) zeigt eine schubförmige Variante mit zusätzlichen Schüben auch in der chronischen Krankheitsphase. Abbildung 2.8 (**B**) verdeutlicht eine zu Beginn schubförmige Variante, die im späteren Verlauf bei kontinuierlich zunehmenden Störungen keine Schübe mehr aufweist. Die chronisch-fortschreitende MS ist generell durch eine nur unvollständige Rückbildung der

Symptome und eine fortschreitende Behinderung zwischen den Schüben gekennzeichnet.

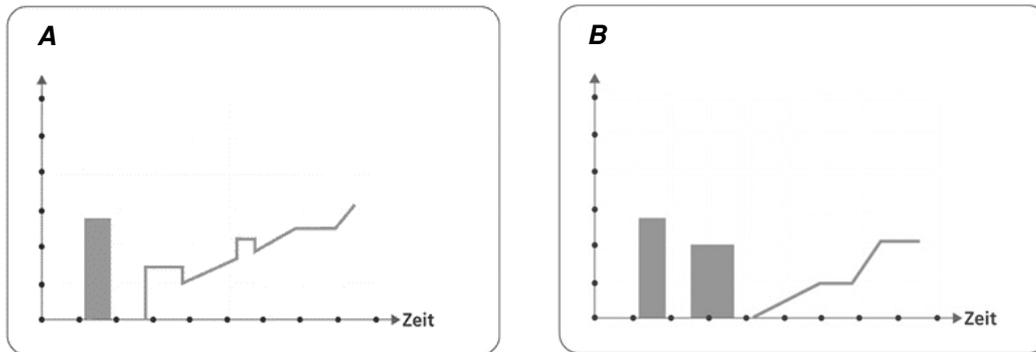


Abbildung 2.8:

Schubförmig-remittierend mit sekundär-progredientem Verlauf der MS (aus www.leben-mit-MS.de)

(A) zeigt eine schubförmige Variante mit zusätzlichen Schüben auch in der chronischen Krankheitsphase. (B) verdeutlicht eine zu Beginn schubförmige Variante, die im späteren Verlauf bei kontinuierlich zunehmenden Störungen keine Schübe mehr aufweist. Die Y-Achse gibt den Schweregrad der Erkrankung wieder.

3.) *Primär-progredienter und progressiv-remittierender Verlauf*

Die primär-fortschreitende oder auch primär-progrediente MS ist sehr selten. Sie verläuft entweder mit stetiger Zunahme der Beschwerden ohne Schübe oder mit zusätzlichen Schüben, die sich vollständig zurückbilden (siehe Abb. 2.9).

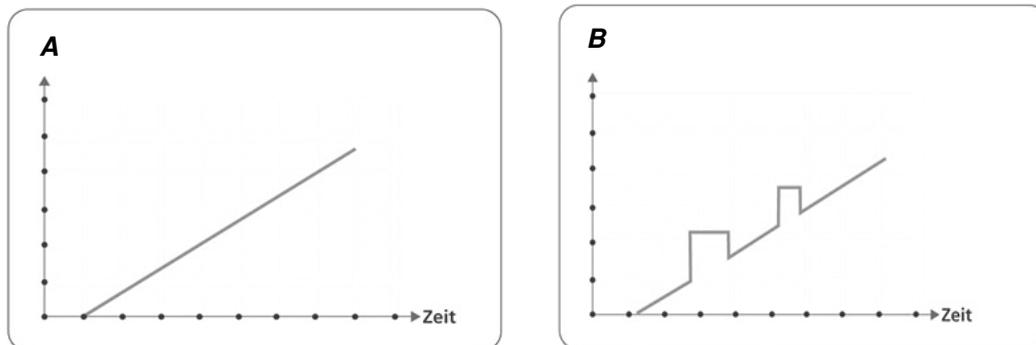


Abbildung 2.9:

Primär-progredienter und progressiv-remittierender Verlauf der MS (aus www.leben-mit-MS.de)

(A) Primär-progrediente MS mit einer stetigen Zunahme der Beschwerden ohne Schübe oder (B) mit zusätzlichen Schüben, progressiv-remittierend, die sich vollständig zurückbilden. Die Y-Achse gibt den Schweregrad der Erkrankung wieder.

Darüber hinaus wird die Multiple Sklerose in maligne und benigne Formen eingeteilt. Man spricht von einer malignen Verlaufsform der Multiplen Sklerose, wenn diese innerhalb eines halben Jahres zu einer signifikant schweren Behinderung führt. Unabhängig von den genannten Verlaufsformen spricht man von einer gutartigen Multiplen Sklerose, wenn Patienten 15 Jahre nach Beginn der Erkrankung noch ohne wesentliche Einschränkungen im Alltag voll aktiv sein können. Die gutartige, benigne MS tritt in 10% der Fälle auf.

2.2.1.5 Pathophysiologie der Multiplen Sklerose

Im frühen Stadium der Multiplen Sklerose sind die Markscheiden zunächst an bestimmten Stellen gerötet und geschwollen. Unter Umständen können sich diese Entzündungsherde vollständig zurückbilden. Meist jedoch zerfallen die Myelinscheiden an den betroffenen Arealen und werden durch Narbengewebe ersetzt. Eine krankhafte Verhärtung des Gewebes setzt ein, die sogenannte „Sklerosierung“. Die einzelnen (Entzündungs-)Herde, auch Plaques genannt, sind in unterschiedlicher Größe über das gesamte zentrale Nervensystem verteilt. Besonders häufig finden sie sich an Sehnerven, im Hirnstamm, im Cerebellum und an den Hintersträngen des Rückenmarks. An den beschädigten Arealen der Myelinscheiden ist die Weiterleitung der Erregung gestört und auch die Axone selbst werden mehr oder weniger stark geschädigt. Dabei treten axonale Schädigungen nicht nur in chronischen Verlaufsformen oder späten Stadien der Erkrankung auf, sondern sind von Anfang an beteiligt (Stadelmann und Bruck, 2003). Innerhalb der aktiven Entzündungsherde sind infiltrierende Immunzellen und die damit einhergehende Demyelinisierung vor allem in den perivaskulären Bereichen zu finden. Unter den infiltrierenden Immunzellen befinden sich oligoklonale CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (Traugott et al., 1983; Hauser et al., 1986) sowie $\delta\gamma$ -T-Zellen (Wucherpfennig et al., 1992), B-Zellen, Plasmazellen sowie aktivierte Makrophagen, in deren Innerem sich Myelinfragmente nachweisen lassen (Prineas und Wright, 1978).

In einer umfangreichen histopathologischen Studie an aktiven MS-Läsionen wurden, basierend auf dem Ausmaß der Demyelinisierung, Umfang und Lage der Läsionen, der Beteiligung des Komplementsystems sowie anhand des Zerstörungsmusters der Oligodendrozyten, vier pathologische Muster (engl.: Pattern) definiert (siehe Tab. 2.10 aus Lucchinetti et al., 2000). Allen vier Kategorien ist die Beteiligung von T-Zellen gemeinsam, darüber hinaus sind in MS-Läsionen der **1. Kategorie** (sogenannte „Makrophagen-assoziierte Demyelinisierung“) vor allem Makrophagen und aktivierte Mikroglia vorhanden.

Im Unterschied dazu weisen Läsionen der **2. Kategorie** (der „Antikörper-vermittelten Demyelinisierung“) zusätzlich eine Ablagerung von Immunglobulinen (vor allem IgG) und Komplementfaktoren, darunter C9neo, auf.

Auch Läsionen der **3. Kategorie** (der „Oligodendroglie-assoziierten Demyelinisierung“) bestehen überwiegend aus T-Zellen und Makrophagen. Das Ausmaß der Demyelinisierung ist hier aber eher diffus und im Unterschied zu Läsionen der 1. und 2. Kategorie nicht perivenös, sondern man findet gerade um die Blutgefäße einen Ring aus intaktem Myelin. Ein auffälliges Merkmal von MS-Läsionen dieser Kategorie ist der selektive

Verlust des Myelinproteins MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein), wohingegen andere prominente Myelinproteine wie PLP (Proteolipid-Protein) und MBP (Myelin basisches Protein) noch in den partiell zerstörten Myelinschichten zu finden sind. Darüber hinaus findet man an den Rändern dieser Läsionen Hinweise auf Apoptose innerhalb der Oligodendrozytenpopulation. Da man Letzteres überwiegend in Virus- oder Toxin-induzierter Enzephalomyelitis beobachten kann, könnte in Patienten mit Läsionen der 3. Kategorie auch ein bisher unbekannter Infektionserreger als Verursacher der Multiplen Sklerose in Frage kommen.

Die **4. Kategorie** zeichnet sich durch eine sog. „Primäre Oligodendrozyten-Degeneration“ aus. Auch hier findet die Demyelinisierung vor allem an den Rändern der Läsionen statt und ist auf ein Absterben der Oligodendrozyten zurückzuführen. Im Unterschied zur 3. Kategorie tritt hier aber weder Apoptose auf, noch kommt es zum selektiven Verlust eines bestimmten Myelinproteins. Das Phänomen der Remyelinisierung, in dem es zur Neubildung von Myelin in demyelinisierten Läsionen kommt, tritt nur in Läsionen der 1. und 2. Kategorie auf.

Feature	Pattern I	Pattern II	Pattern III	Pattern IV
Inflammation				
Composition of Infiltrates				
CD3 T cells	197 ± 68	133 ± 18	145 ± 23	134 ± 71
Plasma cells	5.9 ± 1.9	9.3 ± 2.1	5.4 ± 1.6	3.8
Macrophages	1,158 ± 105	931 ± 71	842 ± 91	1,650 ± 30
C9neo	–	++	–	–
Demyelination				
Perivenous pattern	+	+	–	±
Lesion edge	Sharp	Sharp	Ill-defined	Sharp
Concentric pattern	0/10	0/45	8/25	0/3
Oligodendrocytes				
#OG in DM	295 ± 73	249 ± 30	51 ± 24	55 ± 55
DNA frag in OG	±	±	++APO	++PPWM
OG apoptosis	–	–	14–37%	–
Myelin protein loss	Even	Even	MAG >>>	Even
Remyelination				
Shadow plaques	++	++	–	–

Tabelle 2.10:

Die vier Kategorien demyelinisierender Läsionen nach Lucchinetti et al. 2000

Basierend auf der Natur beteiligter Zellen, Geographie und Ausmaß der Plaques, Art der Oligodendrozyten-Zerstörung sowie der Beteiligung von Komplement können MS-Läsionen in vier Kategorien eingeteilt werden. #OG=Oligodendrozytendichte im Zentrum der demyelinisierenden Plaques, DNA frag in OG=Oligodendrozyten mit nukleärer DNA-Fragmentation; PPWM=Plaque umgebende weiße Substanz (engl.: periplaque white matter); Werte entsprechen Zellen/mm²

2.2.1.6 Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose

Zur *Diagnose* der Multiplen Sklerose werden sowohl neurologische als auch radiologische Untersuchungen durchgeführt. Zu den neurologischen Untersuchungen zählt die Aufzeichnung sogenannter evozierter Potenziale, mit deren Hilfe die Leitfähigkeit und damit die Funktionsfähigkeit von Nervenbahnen getestet werden kann. Eine Verzögerung der Latenzzeiten weist auf eine gestörte Erregungsleitung im Nerv hin, bei fortgeschrittener MS kann es auch zu einer Deformierung, Reduktion oder einem Verlust des Potenzials kommen.

Außerdem wird eine Untersuchung des Liquor cerebrospinalis durchgeführt. Bei ca. 90% der MS-Patienten ist die Zusammensetzung des Liquors verändert, und man findet die für MS typischen „oligoklonalen IgG-Banden“ (Kabat, 1948) sowie einen Anstieg in der Anzahl der Plasmazellen, eine lymphozytäre Pleozytose.

Zu den bildgebenden Untersuchungen zählen die Magnetresonanztomographie sowie die Computertomographie. In den damit gewonnenen Schichtbildern des Gehirns können sowohl entzündete und vernarbte Gewebereiche dargestellt als auch mit Hilfe von Kontrastmitteln akute Krankheitsherde beobachtet werden.

Bislang sind nur *Medikamente* verfügbar, die den Verlauf der MS verlangsamen und die bereits aufgetretenen Symptome lindern können, eine Heilung ist bis jetzt jedoch noch nicht möglich. Und da die allermeisten Fälle nicht tödlich verlaufen, ist MS sozusagen eine „Lebensdiagnose“.

Die Medikation der MS beruht auf der Einnahme von Langzeittherapeutika, die ihre Wirkung durch Immunsuppression oder Immunmodulation entfalten. Eine Schwierigkeit bei diesem Wirkprinzip ist, dass eine unspezifische Veränderung des Immunsystems zu einer höheren Infektions- und Krebserkrankungsrate führen kann. Einige derzeit verwendete Medikamente sind Azathioprin (Imurek), Glatirameracetat (Copaxone), Interferone (Betaferon, Avonex, Rebif), Nataliziumab (Tysabri), Mitoxantron (Ralenova) und Immunglobuline (Gamunex). Die Gabe von hoch dosiertem Kortison kann während eines akuten Schubes die Entzündungsreaktion binnen kürzester Zeit beenden. Beim Versagen der Kortisontherapie kann zur Durchbrechung eines akuten Schubes eine Plasmapherese durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf der MS entstehen bei den Patienten oft Symptome, wie neuropathische Schmerzen, Fatigue und Spastiken, die zwar nicht ursächlich zu behandeln sind, die aber verschiedene Medikamente mildern können.

2.2.2 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

2.2.2.1 Einführung in die EAE

Die Entdeckung der EAE, Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis, leitete sich aus den Nebenwirkungen der ersten Tollwutimpfungen ab. Einige Personen, die mit inaktivierten Rabies-Viren, gewonnen aus infizierten Kaninchengehirnen, geimpft worden waren, entwickelten eine akute Enzephalomyelitis. Stuart et al. (1928) konnten zeigen, dass dieselben Krankheitssymptome in Kaninchen – unabhängig vom Rabies-Virus – durch bloße Immunisierung mit Rückenmarksgewebe induziert werden können. Rivers et al. (1933) beschrieben als erste die experimentelle Induktion von Enzephalomyelitis in Primaten, indem sie, durch wiederholte intramuskuläre Injektion von Kaninchenhirnextrakten, Lähmungen begleitet von einer Demyelinisierung induzieren konnten. In Kombination mit CFA (engl.: complete Freund's adjuvants) wurde es möglich, die Krankheit mit nur einer Injektion von Gehirnextrakten, -proteinen oder -peptiden in einer Vielzahl unterschiedlicher Tiere, darunter Nager, Schafe, Hunde usw., zu induzieren (Kabat et al., 1947; Morgan, 1946).

EAE kann aktiv oder passiv induziert werden. Bei der *aktiven Induktion* werden die Tiere mit einem Gemisch aus einem Myelin-Autoantigen mit CFA immunisiert und zusätzlich wird Pertussistoxin appliziert (siehe oben). Bei der *passiven Induktion* werden antigenspezifische, aktivierte T-Zelllinien oder -klone aus zuvor immunisierten Tieren in Empfängertiere transferiert (Paterson et al., 1960). Die klassische EAE in der Lewis-Ratte folgt einer aufsteigenden Paralyse beginnend mit einer Lähmung des Schwanzes über eine Schwächung der Hinterbeine bis zur vollständigen Paralyse beider Hinterbeine und schließlich zur Tetraplegia.

Bislang sind viele verschiedene Myelin-Antigene auf ihre Fähigkeit, EAE zu induzieren, getestet worden, darunter MBP, PLP, MAG und MOG (zusammengefasst in Wekerle und Kurschus, 2006). Die einzelnen EAE-Modelle sind, was Anfälligkeit, klinischer Verlauf und Pathologie betrifft, sehr verschieden und von mehreren Faktoren wie Spezies, Stamm, Geschlecht, Alter sowie Menge des verwendeten Autoantigens abhängig. Die Unterschiede zwischen den einzelnen EAE-Modellen der gleichen Tierart lassen sich zum Teil auf den genetischen Hintergrund wie Variationen in den MHC-Allelen und das Vorhandensein bestimmter Gene für T-Zell-Rezeptoren usw. zurückführen (Swanborg, 1995). Der klinische Verlauf verschiedener EAE-Modelle kann dabei akut, hyperakut, chronisch-progredient oder schubförmig-remittierend sein. Im Unterschied zu den meisten EAE-Modellen haben jene in der Maus den großen Vorteil, dass die Maus generell zu den besterforschten Labortieren zählt,

was die genetische Information, das Vorhandensein verschiedener transgener und „Knock-Out- und -In“-Stämme sowie die Verfügbarkeit immunologischer Reagenzien betrifft. Abhängig von der Wahl des Stammes verläuft die EAE in einer monophasisch-progredienten (z.B. C57BL/6) oder schubförmig-remittierenden (z.B. SJL/J) Variante. Die klinische Erkrankung wird histologisch von einer starken Entzündungsreaktion und in manchen Stämmen, abhängig vom verwendeten Autoantigen, von Demyelinisierung begleitet.

2.2.2.2 Induzierte EAE Modelle in der Maus

In den meisten Protokollen zur aktiven EAE-Induktion in der Maus wird das Autoantigen im Gemisch mit CFA und zusätzlichem Pertussistoxin appliziert. Die im CFA enthaltenen abgetöteten Mykobakterium-tuberculosis-Partikel tragen zur Stimulation der angeborenen Immunantwort und dadurch im Rahmen einer starken Entzündungsreaktion zu einer effektiven Präsentation des Autoantigens bei. Die so induzierte Immunantwort basiert überwiegend auf der Ausbildung von CD4⁺-T_H1-Effektor-T-Zellen sowie auf der Aktivität von Makrophagen. Pertussistoxin unterstützt die Induktion der EAE vermutlich auf mehreren Ebenen. Zum einen könnte es als ADP-Ribosyltransferase inhibitorische G_i-Proteine inaktivieren, darüber hinaus könnte es die Extravasation von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke ins Gewebe erleichtern (Linthicum und Frelinger, 1982; Brabb et al., 1997). Außerdem scheint Pertussistoxin die Toleranz potentiell autoaggressiver T-Zellen aufheben zu können (Waldner et al., 2004) sowie zur Aktivierung des TLR4-Rezeptors auf Zellen der angeborenen Immunantwort beizutragen (Racke et al., 2005).

Im Vergleich zur aktiven Induktion entwickelt sich die EAE bei der passiven Induktion, d.h. beim Transfer bereits aktivierter T-Zellen, rascher (7-10 Tage bei der passiven; 14-20 Tage bei der aktiven Induktion) und ist zudem reproduzierbarer (Wekerle et al., 1994).

Es liegt in ihrer Natur, dass induzierte EAE-Modelle der Maus nur Aspekte der Multiplen Sklerose simulieren und niemals alle Facetten dieser komplexen Erkrankung widerspiegeln können. So tragen in der EAE z.B. überwiegend CD4⁺-T-Zellen, jedoch kaum CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen und Antikörper zur Pathogenese bei, im Unterschied zur Multiplen Sklerose. Außerdem beruht die bei der EAE induzierte Paralyse der Gliedmaßen in einigen Modellen eher auf der Ausbildung von Ödemen und weniger auf einer fortschreitenden Demyelinisierung wie im Fall der Multiplen Sklerose.

2.2.2.3 Transgene Mausmodelle

In der Autoimmunität haben sich transgene Mausmodelle für das Studium der MS-Pathogenese bzw. zur Lösung grundlegender immunologischer Fragestellungen als überaus hilfreich erwiesen. Bislang sind unter anderem mehrere verschiedene HLA-transgene Mäuse, T-Zell- sowie B-Zell-Rezeptor-transgene Tiere und auch sogenannte „humanisierte“ Tiermodelle für verschiedene Autoantigene des zentralen Nervensystems erzeugt und analysiert worden.

HLA-transgene Mäuse

Ein Beispiel für HLA-transgene Tiere sind die von Madsen et al. (1999) erzeugten humanisierten Mäuse, die neben dem MHC-Klasse-II-Gen eines Multiple-Sklerose-Patienten (Allel DRB1*1501 und DRA*0101) auch den spezifischen T-Zell-Rezeptor, der an dieses MHC-Molekül im Komplex mit einem MBP-Peptid binden kann, exprimieren. Da diese Mäuse außerdem auch einen transgenen humanen CD4-Corezeptor tragen, kann so im Tier die Aktivierung humaner, autoreaktiver T-Zellen simuliert werden. Tatsächlich trat bei ca. 4% der transgenen Tiere spontane EAE auf und konnte durch Kreuzen der Tiere auf einen RAG-defizienten Hintergrund sogar auf 100% angehoben werden. Nach der EAE-Induktion mit dem passenden Peptid, MBP₈₄₋₁₀₂, entwickelten diese Tiere MS-ähnliche EAE-Symptome.

Darüber hinaus sind weitere HLA-transgene Mäuse entwickelt worden, unter anderem solche, die als einziges MHC-Klasse-II-Molekül ein chimeres HLA-DR4-IE-Molekül, bestehend aus humanen und murinen Komponenten, exprimierten (Ito et al., 1996). In diesen Tieren konnte mit einer PLP₁₇₅₋₁₉₂-Immunisierung EAE induziert werden, was bedeutete, dass eine humane MHC-Klasse-II-Bindestelle ausreichend war, um mit einem passenden Peptid in einem Tiermodell Autoimmunität zu induzieren.

T-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse

In einem naiven T-Zell-Repertoire liegt die Vorläufer-Zellfrequenz von T-Zellen für einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex bei ca. 1:100.000 (Abbas et al., 2000). Im Unterschied dazu sind in T-Zell-Rezeptor-transgenen Mauslinien die meisten T-Zellen des Repertoires spezifisch für ein bestimmtes Antigen. So ist es möglich, das Verhalten von spezifischen T-Zellen auf unterschiedliche Stimuli *in vivo* und *in vitro* zu analysieren. Nachfolgende Tabelle (Tab. 2.11) gibt einen Überblick über die bereits erzeugten T-Zell-Rezeptor-transgenen Mausmodelle auf dem Gebiet der ZNS-Autoimmunität.

Klon	Antigen	Stamm	MHC	TZR α	TZR β	RAG	Spontane EAE in %	Referenz
172.10	MBP _{Ac₁₋₁₁}	B10.PL	I-A ^u	V α 2.3	V β 8.2	+/+	14-44%	Goverman et al., 1993
19	MBP _{Ac₁₋₁₁}	B10.PL	I-A ^u	V α 4	V β 8.2	-/-	100%	Lafaille et al., 1994
1934.4	MBP _{Ac₁₋₁₁}	B10.PL	I-A ^u	V α 4	V β 8.2	+/+	0%	Liu et al., 1995 Pearson et al., 1997
	MBP ₁₂₁₋₁₅₀	B10.PL	I-A ^u	V α 2	V β 4	+/+	0%	Huseby et al., 2001b
Ob.1A12	MBP ₈₄₋₁₀₂	DBA/2 x C57BL/6	HLA-DR2	V α 3	V β 2.1	-/-	100%	Madsen et al., 1999
4E3	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	SJL/J	I-A ^s	V α 11	V β 16	+/+	83%	Waldner et al., 2000
5B6	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	SJL/J	I-A ^s	V α 4	V β 6	+/+	45%	Waldner et al. 2000
5B6	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	B10.S	I-A ^s	V α 4	V β 6	+/+	0%	Waldner et al., 2004
8.6 / 8.8	MBP ₇₉₋₈₇	C3H	H-2 ^k	V α 8	V β 6/8	+/+	0%	Perchellet et al., 2004
13A	MOG ₃₅₋₅₅	C57BL/6	I-A ^b	V α 2	V β 4	+/+	0%	Mendel et al., 2004
2D2	MOG ₃₅₋₅₅	C57BL/6	I-A ^b	V α 3.2	V β 11	+/+	4% 30% O.N.	Bettelli et al., 2003
2D2 x IgH ^{MOG}	MOG ₁₋₁₂₅ MOG ₃₅₋₅₅	C57BL/6	I-A ^b	V α 3.2	V β 11	+/+	50%	Krishnamoorthy et al., 2006

Tabelle 2.11:

T-Zell-Rezeptor-transgene Mausmodelle in der Autoimmunität des zentralen Nervensystems

Name des ursprünglichen T-Zellklons, verwendetes Antigen, Mausstamm und MHC-Haplotyp, Spezifität der V α - und V β -Ketten des TZR, RAG-Hintergrund (engl.: recombination-activating gene), Prozentsatz des Auftretens spontaner EAE sowie Referenz der Erstpublikation, O.N.=optic neuritis

Die ersten TZR-transgenen Mauslinien, die einen ZNS-Autoantigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimierten, wurden von Goverman et al. (1993) und von Lafaille et al. (1994) entwickelt. Beide TZR-transgenen Linien sind spezifisch für das N-terminale Peptid von MBP, MBP_{Ac₁₋₁₁}, im MHC-Klasse-II-Komplex I-A^u. Die transgenen Linien von Goverman et al. zeigten eine starke Ausrichtung des T-Zell-Repertoires zur CD4⁺-T-Zellpopulation mit einem reduzierten Anteil an CD8⁺-T-Zellen, ein Phänomen, das in TZR-transgenen Tieren häufig zu beobachten ist. Interessanterweise bildeten die von Goverman erzeugten Tiere erst dann spontan EAE aus, wenn sie nicht unter keimfreien SPF- (engl.: specific pathogen free) Bedingungen gehalten wurden. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass Infektionserreger als Auslöser der Multiplen Sklerose in Frage kommen könnten. Nach einer MBP-Immunisierung entwickelten die MBP-TZR-transgenen Tiere schneller und stärker EAE als Wildtyp-Tiere bzw. konnte bereits durch eine Immunisierung mit Pertussistoxin EAE induziert werden. Sich dem anschließend zeigten Lafaille et al. (1994) mit ihrer MBP-TZR-transgenen Mauslinie, dass die Inzidenz der spontanen EAE von 14% auf 100% ansteigt, kreuzt man die Tiere auf einen RAG-defizienten Hintergrund. Diese Experimente zeigten, dass spontane EAE ohne die Beteiligung von B-Zellen oder CD8⁺-T-Zellen entstehen kann, und verdeutlichten darüber hinaus, dass es im Wildtyp-Repertoire eine Zellpopulation geben muss, die das Auftreten spontaner EAE in den meisten Tieren unterdrückte. Tatsächlich konnte etwas später von Olivarez-Villagomez aus dem Labor von Lafaille (1998) gezeigt

werden, dass das Auftreten spontaner EAE durch den Transfer von CD4⁺-T-Zellen in diese Tiere verhindert werden kann. Welche Rolle der genetische Hintergrund, MHC-unabhängig, für die Anfälligkeit von Mäusen gegenüber EAE spielt, veranschaulichten Studien aus dem Labor von Vijay Kuchroo aus Harvard mit PLP₁₃₉₋₁₅₁-spezifischen TZR-transgenen Mäusen. Während PLP₁₃₉₋₁₅₁-TZR-transgene Tiere auf dem SJL/J-Stamm (I-A^s) zu einem sehr hohen Prozentsatz spontan EAE ausbildeten, blieben transgene Tiere des resistenten B10.S-Hintergrundes (I-A^s) davon verschont (Waldner et al., 2000 und 2004). Diese Resistenz wurde zum einen dem geringeren Aktivierungsstatus der Antigen-präsentierenden Zellen in B10.S-Tieren zugeschrieben, zum anderen spielen hier aber auch CD4⁺CD25⁺-T_{reg}-Zellen eine Rolle (Reddy et al., 2005). Im Jahr 2003 wurden von Bettelli et al. die ersten MOG₃₅₋₅₅-spezifischen TZR-transgenen C57BL/6-Tiere (2D2-T-Zellklon) hergestellt. Das Auftreten spontaner EAE in diesen Tieren war mit 4% relativ gering, eine weitaus größere Anzahl der Tiere jedoch entwickelte spontan eine isolierte optische Neuritis (ca. 30%). Durch Verpaaren dieser MOG₃₅₋₅₅-spezifischen TZR-transgenen Tiere (TCR^{MOG}) mit IgH^{MOG}-Mäusen, in welchen die schwere Kette des MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpers 8.18C5 anstelle der endogenen J_H-Sequenz platziert ist („Knock-In“-Tiere, Litzemberger et al., 1997), wurden doppelt-transgene TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-Tiere erzeugt, in denen die Inzidenz der spontanen EAE auf 50% der analysierten Mäuse anstieg (Krishnamoorthy et al., 2006; Bettelli et al., 2006). Außer den bisher beschriebenen CD4⁺-TZR-transgenen Mäusen gibt es seit kurzem auch die ersten MHC-Klasse-I-restringierten T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäuse, die einen MBP₇₉₋₈₇-spezifischen TZR exprimieren (Perchellet et al., 2004).

B-Zell-Rezeptor-transgene Mäuse

Neben T-Zellen spielen sehr wahrscheinlich auch B-Zellen und Antikörper eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der Multiplen Sklerose und EAE (Cross et al., 2001). Bislang gibt es nur ein einziges transgenes Mausmodell, das einen Myelin-spezifischen B-Zell-Rezeptor exprimiert. Litzemberger et al. (1998) erzeugten eine „Knock-In“-Maus, indem sie die schwere Kette des MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpers 8.18C5 an die Stelle der endogenen J_H-Sequenz setzten. Die schwere Kette dieses Antikörpers erkennt ein konformationelles Epitop in der extrazellulären Domäne von MOG. Diese IgH^{MOG}-Tiere sezernieren große Mengen des Autoantikörpers, zeigen aber zu keiner Zeit spontane EAE, weder auf dem resistenten C57BL/6- noch auf dem EAE-anfälligen SJL/J-Stamm. Nach Immunisierung mit Myelinantigenen, anderen als MOG, entwickelten die Tiere jedoch schneller EAE und zeigten zudem stärkere Symptome als Wildtyp-Tiere.

2.2.3 Immunologische Grundlagen der Multiplen Sklerose und EAE

2.2.3.1 Autoantigene in Multipler Sklerose und EAE

Histopathologische Untersuchungen der Multiplen Sklerose zeigten, dass sich die Erkrankung überwiegend auf myelinisierte Areale des ZNS konzentriert. Darüber hinaus konnte bisher eine ganze Reihe von ZNS-Antigenen als Autoantigene in experimentell induzierten EAE-Tiermodellen identifiziert werden (siehe Abb. 2.12).

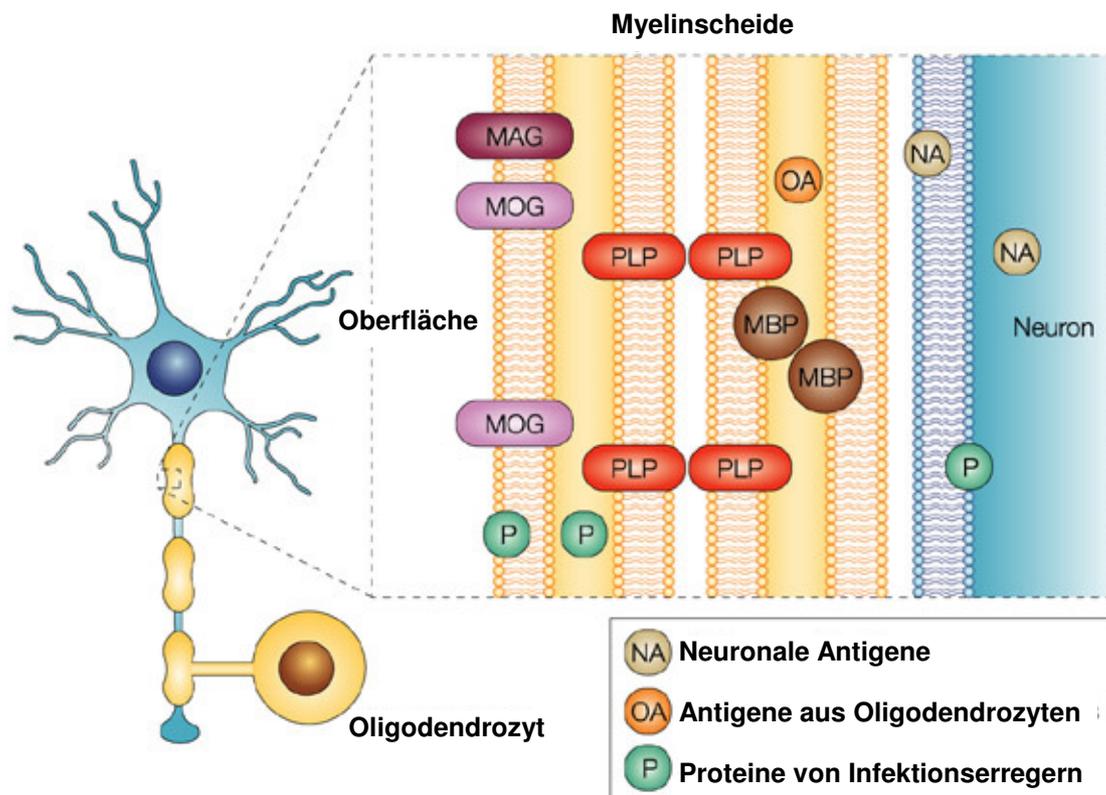


Abbildung 2.12:

Potentielle Antigene in myelinisierten Nervenfasern (Entnommen aus Hemmer et al., 2002)

Proteine der Myelinscheide, der Oligodendrozyten und Neurone sind mögliche Ziele der Immunreaktionen in Multipler Sklerose. Unter den Kandidaten befinden sich Antigene aus Myelin und Neuronen sowie Proteine, die von Infektionserregern in diese Zellen eingeführt wurden.

MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein)

MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein)

PLP (Proteolipid Protein)

MBP (Myelin Basisches Protein)

Myelin Basisches Protein, MBP

MBP, das Myelin Basische Protein, ist mit etwa 30% des Gesamtproteins eines der am stärksten vertretenen Myelin-Proteine und sicherlich eines der besterforschten Proteine im Zusammenhang mit Multipler Sklerose und EAE. In Säugern gibt es fünf MBP-Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 14,0 und 21,5 kDA, die durch alternatives Spleißen der 11

Exons innerhalb des Golli-MBP-Lokus (engl.: gene expressed in the oligodendrocyte lineage) zustande kommen (Seamons et al., 2003).

Bei Mäusen wurden mehrere MBP-Epitope gefunden, mit denen enzephalitogene T-Zellklone reagieren bzw. mit denen sich EAE induzieren lässt. In B10.PL- und PL/J-Tieren (I-A^u) ist das N-terminale Peptid Ac₁₋₁₁ dominant, daneben gibt es noch ein zweites subdominantes Epitop, MBP₃₅₋₄₇. In Immunisierungsstudien an Shiverer-Mäusen, die kein MBP exprimieren, konnte gezeigt werden, dass es in B10.PL-Tieren weitere dominante Epitope für MBP, darunter MBP₁₂₁₋₁₅₀, gibt. In SJL/J-Tieren (I-A^s) werden die MBP-Peptide, MBP₈₉₋₁₀₁ und MBP₉₆₋₁₀₉, von T-Zellen erkannt.

Da MBP auch im Thymus exprimiert wird (Fitz und Kalvakolanu, 1995), wäre zu erwarten, dass T-Zellen mit einem hochaffinen T-Zell-Rezeptor für MBP-Epitope deletiert werden. Um diese Frage zu klären, entwickelten Perchellet et al. (2004) zwei TZR-transgene Mäuse, die eine unterschiedliche Affinität für das in H-2K^k-präsentierte MBP₇₉₋₈₇-Epitop hatten. Interessanterweise stellte sich heraus, dass in T-Zellen mit einer geringeren Affinität sowohl eine Deletion im Thymus als auch periphere Toleranz stattfanden. Hingegen wiesen T-Zellen mit einer höheren Affinität keinerlei Anzeichen von Toleranzinduktion auf und waren darüber hinaus sogar in der Lage, die Toleranzinduktion in den T-Zellen mit einer geringeren Affinität zu verhindern, indem sie H-2K^k-MBP₇₉₋₈₇-Komplexe von APCs entfernten, ohne selbst dabei zu proliferieren.

Proteolipid-Protein, PLP

Das membranständige Protein PLP, (Proteolipid-Protein) ist mit ca. 50% der Gesamtproteinmenge das häufigste Protein des ZNS (Swanborg, 1995). Im Unterschied zu MBP ist es sehr hydrophob. In Mäusen sind zwei PLP-Isoformen, eine vollständige Variante mit 276As und die sogenannte DM-20-Isoform, in der 35As fehlen, beschrieben (Baumann und Pham-Dhin, 2001). Während im ZNS überwiegend die vollständige Variante von PLP vorkommt, exprimieren die Zellen des Thymus und der peripheren Lymphorgane meist die verkürzte DM-20-Isoform. Diese gewebsspezifische Expression der PLP-Isoformen hat zur Folge, dass weder im Thymus noch in den peripheren Lymphorganen Toleranz gegen den fehlenden Bereich von PLP generiert werden kann. So entspricht es dem heutigen Verständnis der Immuntoleranz, dass genau jenes Peptid von PLP, PLP₁₃₉₋₁₅₁, in SJL/J-Mäusen immundominant und enzephalitogen ist, das in der verkürzten PLP-DM-20-Isoform fehlt (Klein et al., 2000).

Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MOG

MOG, das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, trägt mit 0.05% des Gesamtproteins nur einen relativ kleinen Teil zu den Myelinproteinen bei. MOG ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer Größe von 218As, wovon 125As in Form einer immunglobulin-ähnlichen Domäne in den extrazellulären Bereich ragen (siehe Abb. 2.13; Gardinier et al., 1992;).

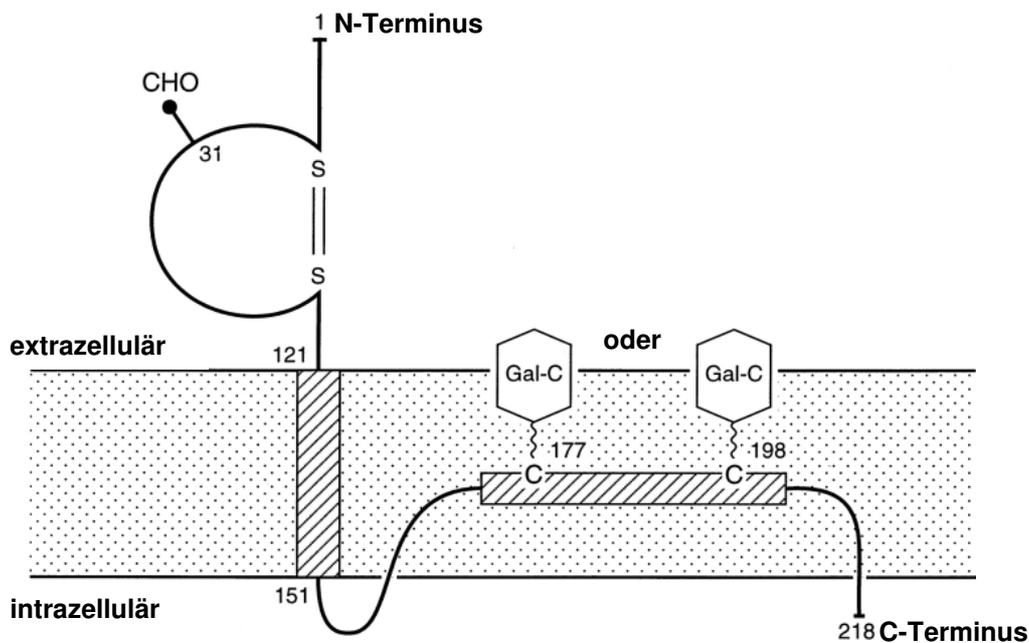


Abbildung 2.13:

Hypothetische Darstellung der Membrantopologie von MOG, Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
(entnommen aus Johns und Bernard, 1999)

MOG ist ein glykosyliertes Typ-I-Membranprotein mit einer typischen transmembranen Domäne und einer zweiten hydrophoben Domäne, die fest mit der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran assoziiert bzw. in sie integriert ist. Die zwei Cysteine an Position 177 und 198 könnten über Galaktocerebroside mit Palmitinfettsäureresten der Zellmembran verknüpft sein.

MOG wird im distalen Bereich des MHC-Lokus kodiert und ist somit eng mit Genloci assoziiert, die bei der Multiplen Sklerose und EAE eine Rolle spielen (Lambracht et al., 1995; Pham-Dinh et al., 1993 und 1996). *MOG*-mRNA-Transkripte konnten, im Unterschied zu *MBP*, α -Cristallin sowie der *PLP-DM-20*-Isoform nur in einer Subpopulation von medullären Epithelzellen des Thymus, mTECs, aber nicht in peripheren Lymphorganen nachgewiesen werden (Derbinski et al., 2001). Während der Entwicklung der Myelinscheide wird *MOG* erst relativ spät exprimiert und dient deshalb auch als Marker für die Oligodendrozyten-Reifung. Die genaue Funktion von *MOG*, das zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert ist (siehe Abb. 6.1), ist noch nicht bekannt. *MOG*-defiziente Tiere entwickeln sich phänotypisch unauffällig (Delarasse et al., 2003; Linares et al., 2003).

Im Jahr 1986 wurde *MOG* als primäres Ziel der Autoantikörper-vermittelten Demyelinisierung im Rahmen der EAE entdeckt und ist noch heute das einzig bekannte

Autoantigen der Myelinscheide, das neben einer T-Zell- auch eine B-Zell-Antwort induzieren kann (Lebar et al., 1986; Iglesias et al., 2001). Letzteres liegt vermutlich an seiner Lokalisation an den äußeren Schichten der Myelinscheide, die es auch für den Angriff von Antikörpern zugänglich macht. Sowohl in EAE-Tiermodellen als auch in Multiple-Sklerose-Patienten sind T- als auch B-Zell-Antworten gegenüber MOG identifiziert worden (Kerlero de Rosbo et al., 1997).

MOG-spezifischen Immunglobulinen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, wie es die umfangreichen Studien mit dem demyelinisierenden Antikörper 8.18C5 in der Maus-EAE oder der Nachweis von MOG-spezifischen Antikörpern im Serum und Liquor von MS-Patienten zeigen (Linnington et al., 1984; Xiao et al., 1991). In EAE-Studien an Meerkatzen konnte gezeigt werden, dass MS-typische, demyelinisierende Läsionen nur mit einer T- und B-Zell-Antwort gegenüber MOG, nicht aber gegenüber MBP oder PLP induziert werden können (Genain et al., 1995). Darüber hinaus gelang es derselben Arbeitsgruppe um Genain et al. (1999), unter Verwendung von Immunogold-markierten MOG-Peptiden in akuten Läsionen von MS-Patienten MOG-spezifische Autoantikörper, die an zerstörtes Myelin gebunden waren, nachzuweisen.

Bislang ist noch nicht genau geklärt, welcher Mechanismus dieser Antikörper-vermittelten Demyelinisierung zugrunde liegt. Nach Piddlesden et al. (1993) könnte das demyelinisierende Potential von MOG-spezifischen Antikörpern auf ihrer Fähigkeit zur Komplement-Fixierung beruhen. Außerdem könnten die Antikörper über den Mechanismus des sogenannten ADCC (engl.: antibody-dependent cell cytotoxicity) zur Demyelinisierung beitragen. Darüber hinaus zeigten biochemische Studien der Plasmamembran von Oligodendrozyten, dass es nach der Stimulation mit MOG-spezifischen Antikörpern zu Veränderungen im Phosphorylierungsmuster bestimmter Signalproteine (MAPK, β -tubulin, G β 1-2) und außerdem zur Umverteilung von MOG in „lipid-rafts“ kommt (Marta et al., 2003). Da „lipid-rafts“ bekanntlich als spezialisierte Plattformen für die Initialisierung von Signaltransduktions-Vorgängen gelten, wird vermutet, dass auch die Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signaltransduktions-Wege zur Demyelinisierung beitragen könnten (Marta et al., 2005).

Weitere Myelin- und Myelin-assoziierte Antigene

Außer den oben beschriebenen Proteinen gibt es noch eine Reihe weiterer Myelin- und Nicht-Myelin-spezifischer Antigene, die in der Pathogenese der EAE und Multiplen Sklerose von Bedeutung sind. Dazu zählen MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein), OSP

(Oligodendrozyten-spezifisches Protein), MOBP (Myelin-assoziiertes Oligodendrozyten Basisches Protein), CNPase (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase), α - und β -Cristallin sowie S100 β .

Arbeiten, unter anderem von Morris Downes et al. (2002) aus der Arbeitsgruppe um Sandra Amor, zeigten, dass jeweils verschiedene Epitope aus MAG, OSP oder CNPase in SJL/J- (H-2^s) oder ABH-Tieren (H-2^{Ag7}) immunodominant bzw. enzephalitogen sind. Während es sowohl MAG- als auch OSP-Peptide gab, die in ABH-Mäuse enzephalitogen waren, konnten in der SJL/J-Maus nur mit OSP-Peptiden Immunantworten generiert werden. Außerdem war es zwar möglich, in beiden Stämmen mit CNPase-Peptiden T-Zell-Antworten zu erzeugen, es gelang jedoch nicht, mit einem CNPase-Peptid auch eine klinische EAE zu induzieren.

2.2.3.2 „Epitope Spreading“

In Mäusen und wahrscheinlich auch beim Menschen kommt es bei einer chronischen Erkrankung zum sogenannten „Epitope Spreading“ (Lehmann et al., 1992). Im Bereich der EAE versteht man unter „Epitope Spreading“ eine zweite bzw. dritte oder vierte Welle an neu gebildeten autoaggressiven T-Zellen, die spezifisch für ein anderes Epitop als das, welches die EAE ursprünglich hervorgerufen hat, sind. Diese neu gebildeten T-Zellen könnten die Ursache für einen Krankheitsrückfall nach einer Phase der Remission sein und somit eine mögliche Erklärung für den charakteristischen schubförmig-remittierenden Verlauf der Multiplen Sklerose und mancher EAE-Modelle liefern. Milzzellen von MS-Patienten zeigen im Verlauf der Erkrankung Reaktivitäten gegenüber verschiedenen Myelinepitopen. Dies können zum einen neue Epitope aus demselben Molekül (intramolekulares Epitope Spreading) oder aus anderen ZNS-Proteinen (intermolekulares Epitope Spreading) sein (McRae et al., 1995). Nach Immunisierung von SWRxSJL-Mäusen mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ treten neue T-Zell-Epitope in einer definierten sequentiellen Kaskade auf, beginnend mit PLP₂₄₉₋₂₇₃ (nach 4 Wochen), MBP₈₇₋₉₉ (nach 7 Wochen) und PLP₁₇₃₋₁₉₈ (nach 12 Wochen) (Tuohy, 1996).

2.2.3.3 Immunologische Vorgänge in Multipler Sklerose und EAE

CD4⁺-T-Zellen

Nach neueren Erkenntnissen können Multiple Sklerose und EAE nicht mehr nur als klassische CD4⁺-T_H1-Immunreaktion angesehen werden. Seit den Arbeiten von Ferber et al. (1996) mit Mäusen, deren IFN γ -Genlocus zerstört war (IFN γ ^{-/-}), ist bekannt, dass IFN γ für die Induktion von EAE nicht benötigt wird bzw. die EAE in IFN γ ^{-/-}-Tieren sogar in gravierenderem Ausmaß verläuft als in Wildtyp-Tieren. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der kürzlich beschriebenen T_H17-Zellpopulation liegen, da diese Zellen zum einen vermehrt in den IFN γ ^{-/-}-Tieren zu finden waren bzw. sich IL-17^{-/-}-Mäuse wiederum relativ resistent gegenüber der Induktion von EAE verhielten (Komiyama et al., 2006). In diesem Zusammenhang kommt den Studien der Zytokine IL12 (aufgebaut aus der p35- und p40-Untereinheit) und IL23 (aufgebaut aus der p19- und p40-Untereinheit) eine besondere Rolle zu. Während IL12 für die Ausbildung von T_H1-Effektorzellen benötigt wird (siehe Abb. 2.6), wird das Zytokin IL23, das wie IL12 die p19-Untereinheit enthält, für die Aufrechterhaltung und Expansion von T_H17-Zellen benötigt. Arbeiten mit p19^{-/-}-, p35^{-/-}- und p40^{-/-}-Knock-Out-Mäusen unter anderem von Cua et al. (2003) haben gezeigt, dass nicht den IL12-abhängigen T_H1-, sondern vor allem den IL-23-gesteuerten T_H17-Effektorzellen in autoimmunen Entzündungsreaktionen im ZNS eine zentrale Bedeutung zukommt.

CD8⁺-T-Zellen

Im Unterschied zu den EAE-Tiermodellen sind in Läsionen von Multiple-Sklerose-Patienten vor allem CD8⁺-T-Zellen vorhanden (Friese und Fugger, 2005). In Studien der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulation aus Liquor und Blut von MS-Patienten konnten Jacobsen et al. (2002) eine oligoklonale Expansion der CD8⁺-T-Zellen, nicht aber der CD4⁺-T-Zellen im CSF gegenüber dem Blut der Patienten nachweisen. Darüber hinaus gelang es Babbe et al. (2000), einzelne T-Zellen aus MS-Läsionen zu isolieren und unter Verwendung von Einzel-Zell-PCR (engl.: single cell PCR) die Zusammensetzung ihrer V-Regionen zu bestimmen, was verdeutlichte, dass ein Großteil der CD8⁺-T-Zellen auf einige wenige CD8⁺-T-Zellklone zurückzuführen war. Dass MOG- und MBP-spezifische CD8⁺-T-Zellen aber auch in Tiermodellen in der Lage sind, EAE zu induzieren, konnte in Arbeiten von Sun et al. (2001) und Huseby et al. (2001) aus den Laboren von Cedric Raine bzw. Joan Goverman gezeigt werden.

B-Zellen und Antikörper

Eine Beteiligung von B-Zellen und Antikörpern in der Pathogenese von Multipler Sklerose und teilweise auch EAE ist offensichtlich, ihre genaue Rolle ist aber komplex und widersprüchlich. Der Nachweis der für die MS typischen „oligoklonalen IgG-Banden“ (Kabat, 1948) im Liquor cerebrospinalis der Patienten ist ein fester Bestandteil in der Diagnose dieser Erkrankung, da in den meisten der Patienten (ca. 90%) die Zusammensetzung des Liquors verändert ist. Darüber hinaus konnten MOG- und MBP-spezifische Antikörper im Serum und Liquor von MS-Patienten identifiziert werden (Xiao et al., 1991). Wichtig für das Verständnis der Bedeutung von Antikörpern in der MS-Pathologie waren allerdings die Studien der Arbeitsgruppe um Genain et al. (1999), der es gelang, unter Verwendung von Immunogold-markierten MOG-Peptiden in akuten Läsionen von MS-Patienten MOG-spezifische Autoantikörper nachzuweisen, die an zerstörtes Myelin gebunden waren.

Da aufgrund der Heterogenität der Multiplen Sklerose ein diagnostischer und prognostischer Marker sehr hilfreich wäre, ist die Evaluierung Myelin-spezifischer Antikörper als ein möglicher biologischer Marker Gegenstand derzeitiger Forschung. Die ersten Studien in diese Richtung stammen von Reindl und Linnington (1999), in denen nach MOG- und MBP-spezifischen Antikörpern gesucht wurde, und zwar im Serum von MS-Patienten und von Patienten mit anderen (entzündlichen) neurodegenerativen Erkrankungen (engl.: OIND: other inflammatory neurological diseases; ONND: other non-inflammatory neurological diseases). In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von α -MOG-Autantikörpern und entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungen, also MS und OIND, gefunden werden. Dennoch haben weitere Studien mit größeren Patienten- und Kontrollgruppenzahlen sowie die Verwendung anderer Nachweistekniken gezeigt, dass diese α -MOG-Antikörper zum Teil auch in gesunden Probanden vorkommen bzw. der Nachweis dieser Antikörper auch innerhalb der MS-Patienten großen Schwankungen unterliegt. Deshalb können diese Autoantikörper bislang noch nicht als ein sicherer diagnostischer Marker für die MS verwendet werden (Berger et al., 2003; Reindl et al., 2006; Kuhle et al., 2007). Als Ziele von Autoantikörpern werden im Rahmen der MS-Forschung weitere Myelin- und ZNS-spezifische Antigene in Betracht gezogen, darunter MBP, PLP, MAG, CNPase, Nogo-A, Aquaporin-4 usw.

Die Bedeutung von Antikörpern in EAE-Tiermodellen ist seit den frühen Studien in EAE von Lassmann et al. (1981b) offensichtlich, da es möglich war, durch den Transfer von Serum aus EAE-erkrankten Tieren ins ZNS-Parenchyma oder Liquor von Kontrolltieren eine Demyelinisierung hervorzurufen. Weitere Hinweise, dass B-Zellen bereits in der EAE-

Induktion eine Rolle spielen, konnten von der Arbeitsgruppe um Dorothy-Anne Cross aus der Washington-Universität in St. Louis erbracht werden. Ihre Studien zeigten, dass sich in B-Zell-defizienten Tieren mit der extrazellulären Domäne von MOG, MOG₁₋₁₂₅, keine EAE induzieren lässt, mit dem MOG₃₅₋₅₅-Peptid aber nach wie vor (Lyons et al., 1999). Außerdem muss an dieser Stelle die von Litzenburger et al. (1998) erzeugte „Knock-In“-Maus (IgH^{MOG}) erwähnt werden, in der, anstelle der endogenen J_H-Sequenz, die schwere Kette des MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpers 8.18C5 platziert ist. Die Tiere entwickelten zwar selbst zu keiner Zeit spontane EAE, entwickelten aber nach Immunisierung mit Myelinantigenen verstärkt EAE. Kürzlich wurde erneut die Bedeutung von B-Zellen in der EAE-Pathogenese hervorgehoben, da das Verpaaren der TCR^{MOG}-Tiere (2D2-C57BL/6; Bettelli et al., 2003) mit den eben beschriebenen IgH^{MOG}-Mäusen zum Ausbruch spontaner EAE innerhalb der doppelt-transgenen Tiere führte, wobei auf mehreren Ebenen eine wechselwirkende T-B-Zell-Kooperation in den Tieren beobachtet werden konnte (Krishnamoorthy et al., 2006; Bettelli et al., 2006).

Nachfolgende Abbildung skizziert die möglichen immunologischen Vorgänge bei der Multiplen Sklerose und EAE:

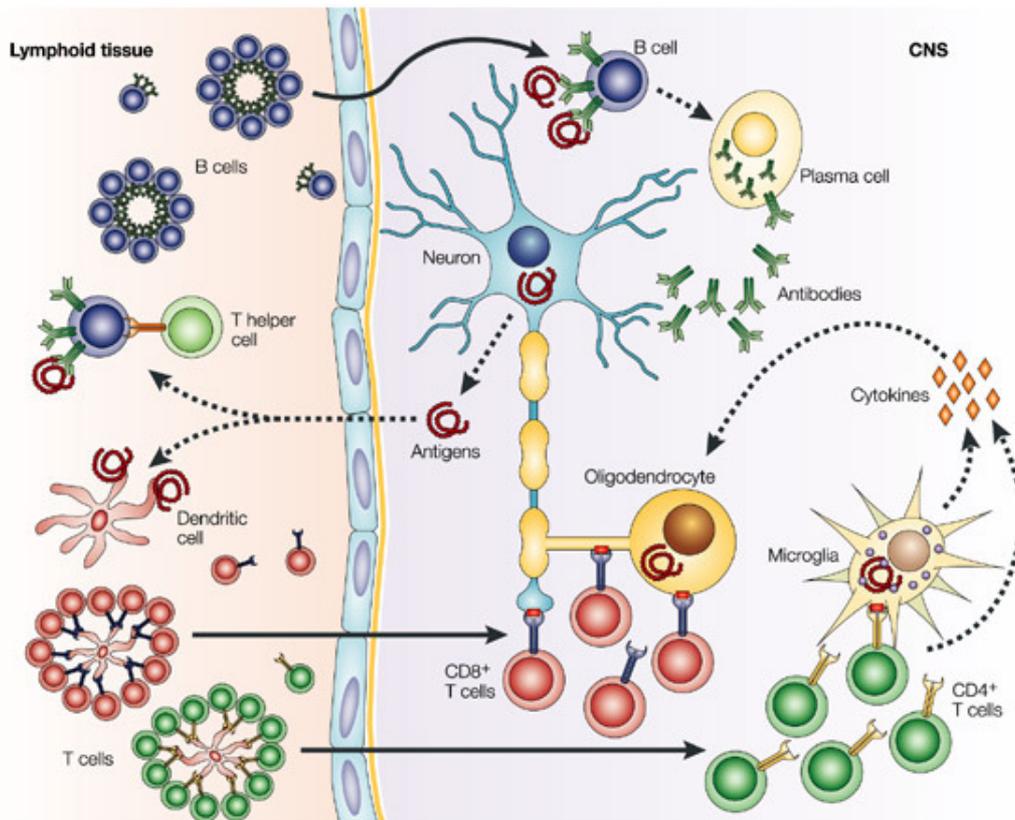


Abbildung 2.14:

Hypothese der immunologischen Vorgänge in Multipler Sklerose und EAE (Entnommen aus Hemmer et al., 2002)

Ursachenunabhängig werden für eine Immunreaktion im ZNS zwei Schritte benötigt. 1.) ein **proinflammatorisches Milieu im ZNS**, das zur Hochregulation von MHC-Molekülen, Costimulatoren und Zytokinen führt. 2.) eine **Antigen-gesteuerte Aktivierung von T- und B-Zellen im peripheren Lymphsystem**. Dabei kann das Antigen entweder aus dem ZNS stammen (wie hier dargestellt), oder es findet eine Kreuzreaktivität mit fremden Antigenen statt. Dendritische Zellen, die Antigene präsentieren, sind starke Stimulatoren für T-Zellen. Nach klonaler Stimulation wandern T- und **B-Zellen** ins ZNS ein, wo B-Zellen nach Restimulation mit ihrem spezifischen Antigen zu **Antikörper**-sezernierenden Plasmazellen heranreifen.

Klonal expandierte **CD8⁺-T-Zellen** könnten im ZNS ihren spezifischen Peptidliganden, präsentiert in MHC-Klasse-I-Molekülen, auf Neuronen oder Glia-Zellen finden und so diese Zellen direkt schädigen. ZNS-infiltrierende **CD4⁺-T-Zellen** könnten dort ihr spezifisches Antigen, präsentiert in MHC-Klasse-II-Molekülen, auf Mikroglia-Zellen antreffen und nach ihrer Reaktivierung inflammatorische Zytokine sezernieren. Diese könnten wiederum andere Immunzellen wie **Makrophagen** anlocken, die zum Entzündungsprozess beitragen, indem sie toxische Substanzen sezernieren und/oder direkt die Myelinscheide mittels Phagozytose angreifen.

3. *Fragestellung*

Tiermodelle, die menschliche Krankheiten möglichst genau simulieren können, sind ein essentieller Baustein in der biomedizinischen Forschung. Erst kürzlich wurde von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) ein doppelt-transgenes Mausmodell ($\text{TCR}^{\text{MOG}} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$) auf dem C57BL/6-Stamm beschrieben, das erstaunlich exakt einzelne Aspekte der Devic-Erkrankung, einer bestimmten Variante der Multiplen Sklerose, widerspiegelt. Etwa genau die Hälfte dieser Tiere, die sowohl MOG-spezifische T- als auch B-Zellen trugen, entwickelte spontan, einem progredienten Krankheitsverlauf folgend, Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Im Unterschied zu der überwiegend im fernöstlichen Raum auftretenden Devic-Erkrankung zeichnet sich die in unseren Breiten dominierende „westliche Variante“ der Multiplen Sklerose durch den typischen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Tiermodell zu entwickeln, das spontane EAE mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf ausbildet. Diese Mäuse wären dann, zumindest was den Krankheitsverlauf betrifft, der „westlichen Variante“ der Multiplen Sklerose sehr ähnlich und könnten bei der Evaluierung therapeutischer Strategien sowie bei der Identifizierung (präklinischer) Marker von großem Wert sein.

Als Autoantigen in den oben beschriebenen Devic-Tieren diente das ZNS-restringierte Protein MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein), welches unter den ZNS-Autoantigenen eine besondere Stellung einnimmt, da es aufgrund seiner Lokalisation an den äußeren Schichten der Myelinscheide sowohl T- als auch B-Zell-Immunantworten zu induzieren vermag. Immunisiert man SJL/J-Mäuse (H-2^{s}) mit MOG in CFA, entwickeln diese Tiere klinische EAE, die meist einem schubförmig-remittierenden Verlauf folgt (Brown und McFarlin, 1981). Im Rahmen vorliegender Arbeit sollten MOG-spezifische T-Zell-Rezeptor-transgene SJL/J-Mäuse entwickelt werden, um mit diesen anschließend folgende Fragestellungen adressieren zu können:

- 1.) Welchen Beitrag leisten MOG-spezifische T-Zellen in SJL/J-Tieren für die Anfälligkeit gegenüber EAE?
- 2.) Wie ist die Pathogenese und der Verlauf der EAE in transgenen TCR^{MOG} -SJL/J-Mäusen?
- 3.) Welchen Effekt hat die Verpaarung mit IgH^{MOG} -Tieren zu doppelt-transgenen $\text{TCR}^{\text{MOG}} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -SJL/J-Tieren?

Gliederung der Arbeit

Vorliegende Arbeit besteht aus vier Teilen, wobei sich der ***erste Teil*** mit der Herstellung von MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor-transgenen SJL/J-Mäusen befasst.

Im ***zweiten Teil*** werden dann drei verschiedene transgene Mauslinien funktionell charakterisiert, die eine unterschiedliche Penetranz (hoch, mittel und gering) der MOG-spezifischen T-Zellen in ihrem T-Zell-Repertoire aufweisen.

Der ***dritte Teil*** behandelt die ***RR-Mäuse*** (aus der transgenen Linie mit der höchsten Penetranz), die spontane EAE in einer meist schubförmig-remittierenden (engl.: relapsing-remitting) Variante entwickeln.

Der ***vierte und letzte Teil*** beschäftigt sich schließlich mit der Charakterisierung MOG-spezifischer Autoantikörper aus dem Serum der ***RR-Mäuse***, die von rekrutierten und aktivierten B-Zellen des endogenen B-Zell-Repertoires dieser Tiere gebildet werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und Mauslinien

Escherichia coli-Stämme

Bezeichnung	Genotyp
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>supE44 thi-1 λ⁻¹ recA1 gyrA96 relA1 Φ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF⁹) U169</i> Bemerkung: LacZ-negatives Derivat von DH5, <i>dam</i> ⁺

Mauslinien

Wildtyp-Linien	Type	H2 MHC	Genetische Details	Vertreiber
SJL/J	Inzucht	H2 ^s	<i>Dysftm</i> (Chrom. 6), <i>Pde6b^{rd1}</i> (Chrom. 5)	Charles River, Deutschland
B10.S/Sg	Kongen	H2 ^s	Donor-Stamm: A.SW/Sn Background Stamm: C57BL/10SnSg	McLaughlin, Research Institut, Montana, USA
FVB	Inzucht	H2 ^q	<i>Pde6b^{rd1}</i> (Chrom. 5)	MPI Biochemie, Martinsried, Deutschland

TZR-C3-Mäuse	Beschreibung	Referenz
TCR ¹⁶⁴⁰ -SJL/J	Ca. 90% peripherer CD4 ⁺ -T-Zellen exprimieren den transgenen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor des T-Zellklons C3	Diese Arbeit 10 x auf SJL/J zurückgekreuzt
TCR ¹⁶³⁹ -SJL/J	Ca. 30% peripherer CD4 ⁺ -T-Zellen exprimieren den transgenen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor des T-Zellklons C3	Diese Arbeit 8 x auf SJL/J zurückgekreuzt
TCR ¹⁵⁸⁶ -SJL/J	Ca. 4% peripherer CD4 ⁺ -T-Zellen exprimieren den transgenen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor des T-Zellklons C3	Diese Arbeit 9 x auf SJL/J zurückgekreuzt
TCR ¹⁶⁴⁰ -B10.S	Ca. 25% peripherer CD4 ⁺ -T-Zellen exprimieren den transgenen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor des T-Zellklons C3	Diese Arbeit 6 x auf B10.S zurückgekreuzt

Knock-in-Mäuse	Beschreibung	Referenz
IgH ^{MOG} -SJL	“Knock-in“ der rearrangierten schweren Kette des MOG-spezifischen Antikörpers 8.18C5 (IgG1 ^a)	Litzenburger et al., 1998 10 x auf SJL/J zurückgekreuzt
IgH ^{MOG} -B10.S	“Knock-in“ der rearrangierten schweren Kette des MOG-spezifischen Antikörpers 8.18C5 (IgG1 ^a)	Litzenburger et al., 1998 6 x auf B10.S zurückgekreuzt

Knock-out-Mäuse	Beschreibung	Referenz
MOG-KO-SJL	Mittels Insertion der <i>nlaZ</i> -Sequenz 7 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons für MOG wurde der <i>MOG</i> -Leserahmen gezielt zerstört.	Delarasse et al., 2003 7 x auf SJL/J zurückgekreuzt
RAG2-KO-SJL	Eine Keimbahn-Mutation führt zur Deletion eines großen Teils der RAG-2 kodierenden Region. <i>In vivo</i> kann aufgrund des RAG-2-Mangels keine V(D)J-Rekombination initiiert werden, was zu einem „severe combined immune deficient“ (SCID) Phänotyp führt.	Shinkai et al., 1992 5 x auf SJL/J zurückgekreuzt
RAG2-KO-B10.S	Eine Keimbahn-Mutation führt zur Deletion eines großen Teils der RAG-2 kodierenden Region. <i>In vivo</i> kann aufgrund des RAG-2-Mangels keine V(D)J-Rekombination initiiert werden, was zu einem „severe combined immune deficient“ (SCID) Phänotyp führt.	Shinkai et al., 1992 5 x auf B10.S zurückgekreuzt

4.1.2 T-Zelllinien und T-Zellklone

T-Zelllinien

Name	Priming Antigen	MHC/ Stamm	Beschreibung
L1	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 5 Restimulationen spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁
L3	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 4 Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität
L4	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber PLP ₁₃₉₋₁₅₁ – nicht weitergeführt
L5	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ – nicht weitergeführt
L6	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ – nicht weitergeführt
L7	MOG ₁₋₂₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₁₋₂₆ – nicht weitergeführt
L8	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆ – nicht weitergeführt
L9	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 3 Restimulationen spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; Kein enzephalitogenes Potential nach 3. Restimulation mit 5x10 ⁶ Zellen i.v.
L10	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 2 Restimulationen nur geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅
L11	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 2 Restimulationen nur geringe Reaktivität gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆
L12	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	In 1. und 2. Restimulation spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; Hohe Basalreaktivität ab 2. Restimulation; Enzephalitogenes Potential n.a.
L13	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ ; 1. und 2. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität
L14	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Auch in 1. und 2. Restimulation nur geringe Reaktivität gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆ ; Hohe Basalreaktivität ab 2. Restimulation
L15	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; 1. Restimulation spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; 2. und 3. Restimulation spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ mit hoher Basalreaktivität
L16	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ ; 1. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität
L17	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 1. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität
L18	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J IgH ^{MOG}	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 1. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität
L19	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J IgH ^{MOG}	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 1. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität
L20	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J IgH ^{MOG}	Primäre Reaktivität unspezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ mit hoher Basalreaktivität; 1. Restimulation spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁ mit hoher Basalreaktivität
L21	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Primäre Reaktivität für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 1. Restimulation spezifisch für MOG ₉₂₋₁₀₆ aber nicht für MOG ₁₋₁₂₅ mit hoher Basalreaktivität
L22	PLP ₁₃₉₋₁₅₁	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber PLP ₁₃₉₋₁₅₁ – nicht weitergeführt
L23	rMOG	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ – nicht weitergeführt
L24	MOG ₉₂₋₁₀₆	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ – nicht weitergeführt
L25	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Keine primäre Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 1., 2., 3. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; Enzephalitogenes Potential nach 2. Restimulation mit 50x10 ⁶ Zellen i.p.

L26	Ovalbumin	H-2 ^S /SJL/J-wt	Hohe primäre Reaktivität gegenüber Ovalbumin und schwach gegenüber Ova ₃₂₃₋₃₃₉ ; In 1., 2. Restimulation spezifisch für Ovalbumin mit hoher Basalreaktivität
L27	Ova ₃₂₃₋₃₃₉	H-2 ^S /SJL/J-wt	Geringe primäre Reaktivität gegenüber Ovalbumin und Ova ₃₂₃₋₃₃₉ ; 1. Restimulation spezifisch für Ovalbumin und Ova ₃₂₃₋₃₃₉ mit hoher Basalreaktivität
SL48	MOG ₁₋₁₂₅	H-2 ^S /SJL/J-wt	Als SL48rMOG R3 übernommen von Gurumoorthy, 4., 5., 6. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; Kein enzephalitogenes Potential nach 5. Restimulation mit 10x10 ⁶ Zellen i.p.

T-Zellklone

Name	Linie (kloniert nach)	Beschreibung	TZR α	TZR β
L1R2	L1 (nach 2. Restimulation)	5 bis 11. Restimulation spezifisch für PLP ₁₃₉₋₁₅₁	V α 2	-
L3R1	L2 (nach 1. Restimulation)	5., 6., 7., 8., 9., 10., 11. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ , MOG ₁₋₂₆ , MOG ₆₃₋₈₇ , MOG ₇₆₋₁₀₁ , MOG ₈₉₋₁₁₃ und MOG ₁₀₁₋₁₂₀ ; (nur in 6. Restimulation Basalreaktivität)	-	V β 4
A5	SL48 (nach 9. Restimulation)	Übernommen von Gurumoorthy; In 2. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 3. Restimulation Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆	-	-
A7	SL48 (nach 9. Restimulation)	Übernommen von Gurumoorthy; In 2. Restimulation Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 3., 4. Restimulation Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 4. Restimulation hohe Basalreaktivität	-	-
A9	SL48 (nach 9. Restimulation)	Übernommen von Gurumoorthy; In 2. Restimulation keine Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
A10	SL48 (nach 9. Restimulation)	Übernommen von Gurumoorthy; In 1. Restimulation keine Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C1	SL48 (nach 4. Restimulation)	4., 5., 6., 7. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität	V α 8.3	-
SL48 C2	SL48 (nach 4. Restimulation)	5., 6., 7. Restimulation mit geringer aber spezifischer Reaktivität für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ , MOG ₁₋₂₆ , MOG ₆₃₋₈₇ , MOG ₇₆₋₁₀₁ , MOG ₈₉₋₁₁₃ und MOG ₁₀₁₋₁₂₀ ; In 8. Restimulation hohe Basalreaktivität	-	V β 2
SL48 C3	SL48 (nach 4. Restimulation)	5., 6., 7., 8., 9., 10., 11. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ , MOG ₉₂₋₁₀₆ und MOG ₈₉₋₁₁₃ aber nicht für MOG ₇₆₋₁₀₁ ; Enzephalitogenes Potential nach 5. Restimulation mit 20x10 ⁶ Zellen i.p.	V α 8.3	V β 4
SL48 C4	SL48 (nach 4. Restimulation)	5., 6., 7., 8. Restimulation mit geringer aber spezifischer Reaktivität für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆	-	V β 2
SL48 C6	SL48 (nach 4. Restimulation)	In 7. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C9	SL48 (nach 4. Restimulation)	In 7. Restimulation keine Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C10	SL48 (nach 4. Restimulation)	5., 6., 7., 8. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ ; Ab 8. Restimulation hohe Basalreaktivität	V α 8.3	-
SL48 C13	SL48 (nach 4. Restimulation)	In 6. Restimulation keine Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 7. Restimulation mit hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C14	SL48 (nach 4. Restimulation)	In 7. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.

SL48 C15	SL48 (nach 4.Restimulation)	5. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; 7. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität	Vα8.3	-
SL48 C16	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C17	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C18	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 6. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆ ; 7. Restimulation keine Reaktivität gegenüber rMOG und MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C19	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7., 8. Restimulation keine Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit sehr hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C20	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
SL48 C21	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 6. Restimulation keine Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; 7. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C22	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 6., 7., 8. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität	Vα8.3	-
SL48 C23	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7. Restimulation keine Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 8. Restimulation kaum Reaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C24	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 6. Restimulation keine Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 7. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C25	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 7. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 8. Restimulation unspezifische sehr hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
SL48 C26	SL48 (nach 4.Restimulation)	In 6. Restimulation geringe Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 7. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 8. Restimulation unspezifische sehr hoher Basalreaktivität	Vα8.3	-
B1	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ4
B2	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ4
B3	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₁₋₂₁ , MOG ₁₁₋₃₁ , MOG ₂₁₋₄₁ , MOG ₃₁₋₅₁ , MOG ₄₁₋₆₁ , MOG ₅₁₋₇₁ , MOG ₆₁₋₈₁ und MOG ₁₀₁₋₁₂₀ ; Kein enzephalitogenes Potential nach 10. Restimulation mit 10x10 ⁶ Zellen i.p.	Vα2	Vβ4
B5	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 6., 7., 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ4
B6	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 6. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
B7	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8. Restimulation kaum Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und keine gegenüber MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
B8	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8., 9. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 9. Restimulation unspezifisch mit hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
B9	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ2; Vβ4
B10	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 6. Restimulation geringe Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 7., 8., 9., 10., 11. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; Starkes enzephalitogenes Potential nach 10. Restimulation mit 10x10 ⁶ Zellen i.p.	-	Vβ4

B11	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 6., 7., 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht für MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ4
B12	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 7., 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	-	Vβ4
B13	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 7. Restimulation keine Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ; In 8. Restimulation geringe Reaktivität gegenüber MOG ₁₋₁₂₅ aber nicht MOG ₉₂₋₁₀₆	n.a.	n.a.
B14	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 6. Restimulation keine Spezifität für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ mit hoher Basalreaktivität; In 7., 8., 9., 10. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆ ohne Basalreaktivität	-	Vβ4
B15	L21 (Cur. Pr. Ansatz)	In 7., 8. Restimulation unspezifisch mit sehr hoher Basalreaktivität	n.a.	n.a.
D1	L25 (Cur. Pr. Ansatz)	In 5. Restimulation spezifisch für MOG ₁₋₁₂₅ und MOG ₉₂₋₁₀₆	-	-.

Weitere Zelllinien

Name	Ursprung	Beschreibung
58α-β-	DO-11.10.7 Maus-T-Zell-Hybridom	T-Zell-Hybridom ohne funktionelle T-Zell-Rezeptor α- und β-Ketten aufgrund eines nicht-funktionellen Vα-Jα-Rekombination mit einem Vα-Pseudogen-Segment
EL4	C57BL/6-Maus-Lymphom	Erzeugt aus einem Lymphom welches mittels 9, 10-Dimethyl-1, 2-Benzanthrazen in C57BL/6-Mäusen erzeugt wurde
EL4-MOG	C57BL/6 Maus-Lymphom	s.o. und stabile, retrovirale Oberflächen-Expression der vollständige Sequenz von Ratten-MOG ₁₋₁₂₅ ; von Gurumoorthy übernommen

4.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

Vektoren

Name	Größe	Resistenzen	Vertreiber / Referenz
pBluescript II KS	2.961 kb	Amp ^R	Stratagene, La Jolla, CA
pcDNA3.1 (-)	5.427 kb	Amp ^R	Invitrogen, Paisley, Schottland
pcDNA3.1 / zeo	5.015 kb	Amp ^R	Invitrogen, Paisley, Schottland
pHSE3'	7.8 kb	Amp ^R	Pircher et al., 1989
RSV5 neo ^R	5.108 kb	Amp ^R / Neo ^R	K. Dornmair
RSV5 hyg ^R	5.108 kb	Amp ^R / Hyg ^R	K. Dornmair

cDNA-Plasmide

TCR-V α 8.3-Klone

Name	Primer	Lage	Sequenz #	Status
pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #4	T3	sense	p33137	korrekt
	T7	as	p33138	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. sense	sense	p33273	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. as	as	p33274	
pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #5	-	-	-	-
pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #8	T3	sense	p33139	korrekt
	T7	as	p33140	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. sense	sense	p33275	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. as	as	p33276	
pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #10	-	-	-	-
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #2	T3	as	p33141	Inkorrekt: 2 <i>Bam</i> HI-sites; keine <i>Sal</i> I-site
	T7	as	p33196; p33142	
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #4	-	-	-	-
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #5	T3	as	p33014	Inkorrekt: keine <i>Sal</i> I-site in T3-Sequenz
	T7	sense	p33015	
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #6	T3	as	p33016	Inkorrekt : sense und as gleich
	T7	as	p33017	
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #7	T3	as	p33163	Inkorrekt: keine <i>Bam</i> HI-sites
	T7	as	p33144; p33197	
pBS-V α 8.3-Pfu-Klon #10	T3	sense	p33145	Inkorrekt: keine <i>Sal</i> I-site
	T7	as	p33146	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. sense	sense	p33277	
	mTCR V α 8.3 CDR3 seq. as	as	p33278	
pHSE3'-V α 8.3 (pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #4) Klon #1	alpha CDR3 sense	sense	p33887	korrekt
	alpha CDR3 AS	as	p33888	
	pH2kb sense	sense	p33889	
	h V beta globin AS	as	p33890	
pHSE3'-V α 8.3 (pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #4) Klon #2	alpha CDR3 sense	sense	p33891	korrekt
	alpha CDR3 AS	as	p33892	
	pH2kb sense	sense	p33893	
	h V beta globin AS	as	p33894	
pRSV5 _{hygro} -V α 8.3 (pBS-V α 8.3-HiFi Klon #4)	Über die <i>Bam</i> HI- und <i>Sal</i> I-Schnittstellen gerichtet in pRSV5 _{hygro} ligiert und mit Kolonie-PCR auf korrekte Insertion und Orientierung überprüft			
pCDNA3.1-V α 8.3 (pBS-V α 8.3-HiFi-Klon #4) Klon #1; #2; #3; #4; #7; #8	Über die <i>Bam</i> HI- und <i>Xho</i> I-Schnittstellen gerichtet in pCDNA3.1 ligiert und mit Kolonie-PCR auf korrekte Insertion und Orientierung überprüft			

TCR-V β -Klone

Name	Primer	Lage	Sequenz #	Status
pBS-V β 4-HiFi-Klon #4	-	-	-	-
pBS-V β 4-HiFi-Klon #8	T3	sense	p33147	korrekt
	T7	as	p33148	
pBS-V β 4-HiFi-Klon #9	T3	as	p33448	Inkorrekt: T3- und T7-Sequenz inkompatibel
	T7	sense	p33449; p33581	
	mTCR V β 4 sense #1	sense	p33582	
pBS-V β 4-Pfu-Klon #1	T3	sense	p33010	korrekt
	T7	as	p33011	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. sense	sense	p33281	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. as	as	p33282	
pBS-V β 4-Pfu-Klon #2	T3	as	p33012	korrekt
	T7	sense	p33013	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. sense	sense	p33279	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. as	as	p33280	
pBS-V β 4-Pfu-Klon #3	-	-	-	-
pBS-V β 4-Pfu-Klon #5	-	-	-	-
pBS-V β 4-Pfu-Klon #6	-	-	-	-
pBS-V β 4-Pfu-Klon #8	-	-	-	-
pBS-V β 4-Pfu-Klon #10	-	-	-	-
pBS-V β 4-Pfu-Klon #1 <i>XhoI</i> → <i>Bg/III</i> PM-Klon #1	T3	sense	p33583	Punktmutation erfolgreich eingeführt
	T7	as	p33584	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. sense	sense	p33585	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. as	as	p33586	
pBS-V β 4-Pfu-Klon #1 <i>XhoI</i> → <i>Bg/III</i> PM-Klon #3	T3	sense	p33587	Punktmutation erfolgreich eingeführt
	T7	as	p33588	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. sense	sense	p33589	
	mTCR V β 4 CDR3 seq. as	as	p33590	
pHSE3'-V β 4 (pBS-V β 4-Pfu-Klon #1 <i>XhoI</i> → <i>Bg/III</i> PM-Klon #3)- Klon #1	beta CDR3 sense	sense	p33879	korrekt
	beta CDR3 AS	as	p33880	
	pH2kb sense	sense	p33881	
	h V beta globin AS	as	p33882	
pHSE3'-V β 4 (pBS-V β 4-Pfu-Klon #1 <i>XhoI</i> → <i>Bg/III</i> PM-Klon #3)- Klon #2	beta CDR3 sense	sense	p33883	korrekt
	beta CDR3 AS	as	p33884	
	pH2kb sense	sense	p33885	
	h V beta globin AS	as	p33886	
pRSV5 _{neo} -V β 4 (pBS-V β 4-Pfu Klon #1 <i>XhoI</i> → <i>Bg/III</i> PM Klon #3)	Insert mit <i>SalI</i> geschnitten und glatt gemacht; Dann mit <i>BamHI</i> geschnitten und in pRSV5 _{neo} ligiert, welcher zuvor mit <i>EcoRI</i> geschnitten und glatt gemacht wurde dann mit <i>BamHI</i> geschnitten; Mit Kolonie-PCR auf korrekte Insertion und Orientierung überprüft			
pCDNA3.1-V β 4 (pBS-V β 4-Pfu Klon1)- Klon #1 bis Klon #8	Über die <i>BamHI</i> und und <i>XhoI</i> -Schnittstellen gerichtet in pCDNA3.1 ligiert und mit Kolonie-PCR auf korrekte Insertion und Orientierung überprüft			

Oligonukleotide und Real-time-PCR-Proben

Bezeichnung / RE	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz / T _M
TCR-Vα-Primer		
mTCR-V α 8.3 sense #1 / <i>Sal-I</i>	TCR-V α 8.3	5'-AGGTGTCGACCTTCCATGAACATGCGTCCTG ACACC-3' / 61.6°C
mTCR-alpha C as #1 / <i>BamHi</i>	TCR- α -C-Region	5'-ATAGGATCCTCAACTGGACCACAGCCTCA GC-3' / 61.6°C
mTCR-V α 8.3-CDR3 seq. sense	TCR-V α 8.3	5'-CTCCATAAGAGCAGCAGCTCC-3' / 57.6°C

mTCR-V α 8.3-CDR3 seq. as	TCR-V α 8.3	5'-GGATCTTTTAACTGGTACACAGCAGG-3' / 57.5°C
----------------------------------	--------------------	--

TCR-V β -Primer	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz / T _M
mTCR-V β 4 sense #1 / <i>Sal-I</i>	TCR-V β 4	5'-GGTGTCTGACTGACACTGCTATGGGCTCCATT TTCCTC-3'/ 62°C
mTCR-beta C1 as #1 / <i>BamHi</i>	TCR- β -C1-Region	5'-ATAGGATCCCAGCTCTTGTATTCATCTTCAC ATCTGGCTTC-3'/ 60.3°C
mTCR-beta C2 as #1 / <i>BamHi</i>	TCR- β -C2-Region	5'-ATAGGATCCGGGTGAAGAACGGCTCAGGAT GC-3'/ 62.2°C
mTCR-V β 4-CDR3 seq. sense	TCR-V β 4	5'-CAAGTCGCTTCCAACCTCAAAG-3' / 56.4°C
mTCR-V β 4-CDR3 seq. as	TCR-V β 4	5'-CAATCTCTGCTTTTGATGGCTCAAAC-3' / 57.0°C
mTCR-V β 4- <i>XhoI</i> Mut sense / <i>Bgl-II</i>	TCR-V β 4	5'-CCAGACTGACTGTTCTCGAAGATCTGAGA AATGTG-3'/ 78.1°C
mTCR-V β 4- <i>XhoI</i> Mut as / <i>Bgl-II</i>	TCR-V β 4	5'-CACATTTCTCAGATCTTCGAGAACAGTCA GTCTGG-3'/ 78.1°C

Sonstige Primer	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz
D17Mit33 Primer 1	H-2 ^s coupled satellite	5'-TGTTGGAGCTGAATACACGC-3'/ 58.4°C
D17Mit33 Primer 2	H-2 ^s coupled satellite	5'-CCAAACACCAGGGTCTCTGT-3'/ 60.5°C
T3 pBluescript Primer	pBluescript	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'/ 45.1°C
T7 pBluescript Primer	pBluescript	5'-AATACGACTCACTATAG-3'/ 45.1°C

Für Genotypisierung	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz
mRAG-2 sense #1	RAG2	5'-GGGAGGACACTCACTTGCCAGTA-3'
mRAG-2 as #2	RAG2	5'-AGTCAGGAGTCTCCATCTCACTGA -3'
Neo-2 #3	Neomycin ^R -Kassette	5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'
nlacZ	lacZ	5'-GATGGGGCGCATCGTAACCGTGC-3'
mMOG sense #1	MOG	5'-AGGAAGGGACATGCAGCCGGAG -3'
mMOG as #2	MOG	5'-CTGCATAGCTGCATGACAACTG -3'
PH-2K ^b sense #1	H-2Kb Promoter	5'-CTGGATATAAAGTCCACGCAGCC-3' / 59.0°C
hu beta-Globin-AS #1	β -Globin-Site	5'-CGTCTGTTTCCCATTCTAAACTGTACC-3'/ 59.2°C

Real-time-PCR-Primer

Bezeichnung	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz
mGAPDH-sense #1	GAPDH	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'
mGAPDH-as #2	GAPDH	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'
mFoxP3 sense #1	FoxP3	5'-AGGAGAAGCTGGGAGCTATGC-3'
mFoxP3 as #2	FoxP3	5'-TGGCTACGATGCAGCAAGAG-3'
mIL-2 sense #1	IL-2	5'-CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA-3'
mIL-2 as #2	IL-2	5'-TCCAGAACATGCCGCAGAG-3'
mIL-4 sense #1	IL-4	5'-ACAGGAGAAGGGACGCCAT-3'
mIL-4 as #2	IL-4	5'-GAAGCCCTACAGACGAGCTCA-3'
mIL-5 sense #1	IL-5	5'-CCGCTCACCGAGCTCTGTT-3'
mIL-5 as #2	IL-5	5'-AGATTTCTCCAATGCATAGCTGG-3'
mIL-10 sense #1	IL-10	5'-CAGAGAAGCATGGCCCCAGAA-3'
mIL-10 as #2	IL-10	5'-TGCTCCACTGCCTTGCTCTT-3'
mIL-13 sense #1	IL-13	5'-GGAGCTGAGCAACATCACACA-3'
mIL-13 as #2	IL-13	5'-GGTCCTGTAGATGGCATTGCA-3'
mIL-17 sense #1	IL-17	5'-AACTCCCTTGGCGCAAAGT-3'
mIL-17 as #2	IL-17	5'-GGCACTGAGCTTCCAGATC-3'

mIFN γ sense #1	mIFN γ	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'
mIFN γ as #2	mIFN γ	5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
mTNF α sense #1	TNF α	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
mTNF α as #2	TNF α	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
mIP-10 sense #1	IP-10	5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCAT-3'
mIP-10 as #2	IP-10	5'-GCTCCCTATGGCCCTCATT-3'
mCD4 sense #1	CD4	5'-CGT TTC CTC TCA TCA TCA ATA AAC TTA-3'
mCD4 as #2	CD4	5'-GGC TGG TAC CCG GAC TGA AG-3'
C3-V α 8.3 sense #1	C3-V α 8.3	5'-CCACGCCACTCTCCATAAGAG-3'
C3-V α 8.3 as #2	C3-V α 8.3	5'-CAGTAGTACAGGCCAGAGTCTGACA-3'
C3-V β 4 sense #1	C3-V β 4	5'-TGATGACTCGGCCACATACTTC-3'
C3-V β 4 as #2	C3-V β 4	5'-CCTGAGCCAAAATACAGCGTTT-3'
IL-23p19 sense #1	IL-23p19	5'-AGCGGGACATATGAATCTACTAAGAGA-3'
IL-23p19 as #2	IL-23p19	5'-GTCCTAGTAGGGAGGTGTGAAGTTG-3'
IL-12p35 sense #1	IL-12p35	5'-TACTAGAGAGACTTCTCCACAACAAGAG-3'
IL-12p35 as #2	IL-12p35	5'-TCTGGTACATCTTCAAGTCCTCATAGA-3'
IL-12p40 sense #1	IL-12p40	5'-GACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGAT-3'
IL-12p40 as #2	IL-12p40	5'-AGGAAAGTCTTGTTTTTGAAATTTTTTAA-3'
ROR γ t sense #1	ROR γ t	5'-CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3'
ROR γ t as #2	ROR γ t	5'-TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'
IL-22 sense #1	IL-22	5'-TCCGAGGAGTCAGTGCTAAA-3'
IL-22 as #2	IL-22	5'-AGAACGTCTTCCAGGGTGAA-3'

Für Genotypisierung	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz
8.18C5 sense #1	Anti-IgH ^{MOG} (8.18C5)	5'-TGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGT-3'
8.18C5 as #2	Anti-IgH ^{MOG} (8.18C5)	5'-GGAGACTGTGAGAGTGGTGCCT-3'
mIgH sense #1	Ig heavy chain	5'-ATTGGTCCCTGACTCAAGAGATG-3'
mIgH as #2	Ig heavy chain	5'-TGGTGCTCCGCTTAGTCAAA-3'

Real-time-PCR-Proben

Bezeichnung	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz	Markierung	
mGAPDH probe #3	GAPDH	5'-ATGCCCCATGTTTGTGATGGGTGT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mFoxP3 probe #3	FoxP3	5'-AAGGCTCCATCTGTGGCCTCAATGGA-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-2 probe #3	IL-2	5'-CCAAGCAGGCCACAGAATTGAAAG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-4 probe #3	IL-4	5'-TCCTCACAGCAACGAAGAACCACA-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-5 probe #3	IL-5	5'-CAGGAAGCCTCATCGTCTCATTGCTTGT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-10 probe #3	IL-10	5'-TGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCC-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-13 probe #3	IL-13	5'-CGGGTTCTGTGTAGCCCTGGATTC-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIL-17 probe #3	IL-17	5'-CCACGTCACCCTGGACTCTCCAC-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIFN γ probe #3	mIFN γ	5'-CACCATCCTTTTGCCAGTTCTCCAG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mTNF α probe #3	TNF α	5'-CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGA-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIP-10 probe #3	IP-10	5'-TCTCGCAAGGACGGTCCGCTG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA

mCD4 probe #3	CD4	5'-CACTTTGAACACCCACAACCTCCA CCTCCT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
C3-V α 8.3 Probe #3	C3-V α 8.3	5'-AGCAGCTCCTTCCATCTGCAGAA GTCC-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
C3-V β 4 Probe #3	C3-V β 4	5'-TGCCAGCAGCCAAGAACGGACA GAT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
IL-23p19 probe #3	IL-23p19	5'-CCAGTTCTGCTTGCAAAGGATCC GC-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
IL-12p35 probe #3	IL-12p35	5'-AGACGTCTTTGATGATGACCCTG TGCCT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
IL-12p40 probe #3	IL-12p40	5'-CCACTCACATCTGCTGCTCCACA AGAAG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
ROR γ t probe #3	ROR γ t	5'-AAGGGCTTCTTCCGCCGCAGCC AGCAG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
IL-22 probe #3	IL-22	5'-TGAGCACCTGCTTCATCAGGTAG CA-3'	5'-FAM	3'-TAMRA

Für Genotypisierung

Bezeichnung	Bindungsstelle	Nukleotid-Sequenz	Markierung	
8.18C5 probe #3	Anti-IgH ^{MOG} (8.18C5)	5'-CCAGTATGGCATGTTTACCATCG TATTACCAGTT-3'	5'-FAM	3'-TAMRA
mIgH probe #3	schwere Kette der Ig	5-'CCTTGCACCAGTCAGAGACCAC AGGG-3'	5'-FAM	3'-TAMRA

4.1 4 Peptide

Bezeichnung	Referenz	Aminosäure-Sequenz N→C	Vertreiber
PPD	-	Variabel : <u>purifid</u> <u>protein</u> <u>derivate</u>	I. Harmann
PLP ₁₃₉₋₁₅₁	SNP30016/63	HSLGKWLGHDPKF	BioTrend, Germany
MOG ₁₋₂₆	Iglesias, A.	GQFRVIGPGYPICALVGDEAELPCR I	-
MOG ₁₋₂₀	P1397	GQFRVIGPGYPICALVGDEA	MPI Biochemie, Germany
MOG ₁₀₋₃₀	P1398	PIRALVGDEAELPCRISPGK	MPI Biochemie, Germany
MOG ₂₀₋₄₀	P1399	ELPCRISPGKNATGMEVGWY	MPI Biochemie, Germany
MOG ₃₀₋₅₀	P1400	NATGMEVGWYRSPFSRVVHL	MPI Biochemie, Germany
MOG ₃₅₋₅₅	-	MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	BioTrend, Germany
MOG ₄₀₋₆₀	P1401	RSPFSRVVHLYRNGKDQDAE	MPI Biochemie, Germany
MOG ₅₀₋₇₀	P1402	YRNGKDQDAEQAPEYRGRTE	MPI Biochemie, Germany
MOG ₆₀₋₈₀	P1403	QAPEYRGRTELLKESIGEGK	MPI Biochemie, Germany
MOG ₆₆₋₉₀	A. Iglesias	PEYRGRTELLKESIGEGKVTLRIQN	-
MOG ₇₉₋₁₀₅	A. Iglesias	ISEGKVTLRIQNVRFSDGGYGTCTFF	-
MOG ₇₆₋₁₀₁	A. Iglesias.	ISEGKVTLRIQNVRFSDGGYGTCTFF	-
MOG ₉₀₋₁₁₁₀	P1406	SDEGGYTCFFRDHSYQEEAA	MPI Biochemie, Germany
MOG ₉₂₋₁₀₆	SNP30025	DEGGYTCFFRDHSYQ	BioTrend, Germany
MOG ₈₉₋₁₁₂	A. Iglesias	RFSDEGGYTCFFRDHSYQEEAAME	-
MOG ₁₀₀₋₁₂₀	P1407	RDHSYQEEAAMELKVEDPFY	MPI Biochemie, Germany
MOG ₁₁₀₋₁₂₅	P1408	MELKVEDPFYVWVNP	MPI Biochemie, Germany
Ova ₃₂₃₋₃₃₉	-	ISQAVHAAHEINE	BioTrend, Germany

4.1.5 Antikörper

FACS-Antikörper

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
B7-DC	FITC	122	Rat IgG _{2a} , κ	eBioscience 11-9972-81
B7RP-1	PE	HK5.3	Rat IgG _{2a} , κ	eBioscience 12-5985-81
Baff-R3	FITC / Biotin	122	Human VH/VL murin IgG2a	Genentech
CD3ε	FITC / PE / APC	145-2C11	Ar. Ham IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553061 / 553063 / 553066
CD4	FITC / PerCP	RM4-5	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen 553021 / 553052
CD8a	Biotin / APC	53-6.7	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen 553028 / 553035
CD11b / Mac-1	PE	M1/70	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553311
CD11c	FITC	HL3	Ar Ham IgG ₁ , λ ₂	Pharmingen / 553801
CD19	FITC / PE / APC	1D3	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553785 / 557399 / 550992
CD21/CD35	FITC	7G6	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553818
CD23	Biotin	B3B4	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553137
CD24 / HSA	FITC	M1/69	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553261
CD25	FITC	7D4	Rat IgM, κ	Pharmingen / 553071
CD25	PE	PC61	Rat (Outbred OFA) IgG ₁ , λ	Pharmingen / 553866
CD28	PE	37.51	Golden Syrian Hamster IgG	eBioscience 12-0281-81
CD40	Biotin	3/23	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553789
CD43	Biotin	S7	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553269
CD44	FITV	IM7	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553134
CD45.1	FITC	A20	Ms IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553775
CD45R / B220	PerCP	RA3-6B2	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553093
CD62L	Biotin	MEL-14	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553149
CD69	PE	H1.2F3	Ar Ham IgG ₁ , λ ₃	Pharmingen / 553237
CD80 / B7.1	Biotin	16-10A1	Ar Ham IgG ₂ , κ	Pharmingen / 553767
CD86 / B7.2	Biotin	GL1	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553690
CD138 / Syndecan-1	Biotin	281-2	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553713
CD154	PE	MR1	Ar Ham IgG ₃ , κ	Pharmingen / 553658
H-2K ^s	FITC	KH49	Ms IgM, κ (IgM ^b)	Pharmingen / 558841
I-A ^k	FITC	10-3.6	Ms IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553540
ICOS	PE	7E.17G9	Rat IgG _{2b} , κ	eBioscience 12-9942-81
IFNγ	FITC	XMG1.2	Rat IgG ₁	Pharmingen / 554411
Ig	APC	Polyklonal	Goat (multiple adsorption)	Pharmingen / 550826
IgG ₁	PE / Biotin	A85-1	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 550083

IgM ^a / Igh-6a	Biotin	DS-1	Ms IgG ₁ , κ (mouse IgG ₁ ^b)	Pharmingen / 553515
IgM ^b / Igh-6b	Biotin	AF6-78	Ms IgG ₁ , κ (mouse IgG ₁ ^a)	Pharmingen / 553519
IL-17	PE	TC11-18H10	Rat IgG ₁	Pharmingen / 559502
IL-4	FITC	BVD4-1D11	Rat IgG _{2b}	Pharmingen / 554388
anti-MOG	FITC	8.18C5	Mouse IgG ₁	In house
MOG (Protein)	FITC		-	In house
NK1.1	Biotin	PK136	Ms IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553163
Peanutagglutinin	Biotin	Lectin Arachis hypogaea	-	Sigma / L6135
TCRβ chain	FITC	H57-597	Ar Ham IgG ₂ , α2	Pharmingen / 553170
Tim-3	PE	8B.2C12	Rat IgG ₁ , κ	ebioscience 12-5871-81
TNFα	FITC	MP6-XT22	Rat IgG ₁	Pharmingen / 554418
Vα 2TCR	FITC	B20.1	Rat IgG _{2a} , λ	Pharmingen / 553289
Vα 3.2 TCR	FITC	RR3-16	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553218
Vα 8.3 TCR	PE	B21.14	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553377
Vα 11.1/2 ^{b,d} TCR	FITC	RR8-1	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553222
Vβ2 TCR	FITC	B20.6	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553280
Vβ 3 TCR	FITC	KJ25	Ar Ham IgG ₂ , κ	Pharmingen / 553208
Vβ 4 TCR	FITC	KT4	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553365
Vβ 5.1/2 TCR	FITC	MR9-4	Ms IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553189
Vβ 6 TCR	FITC	RR4-7	Rat IgG _{2b} , λ	Pharmingen / 553193
Vβ 7 TCR	FITC	TR310	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553215
Vβ 8.1/2 TCR	FITC	MR5-2	Ms IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553185
Vβ 8.3 TCR	FITC	1B3.3	Ar Ham IgG ₃ , κ	Pharmingen / 553663
Vβ 9 TCR	FITC	MR10-2	Ms IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553201
Vβ 10b TCR	FITC	B21.5	Rat IgG _{2a} , λ	Pharmingen / 553284
Vβ 11 TCR	FITC	RR3-15	Rat IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 553197
Vβ 12 TCR	FITC	MR11-1	Ms IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553300
Vβ 13 TCR	FITC	MR12-3	Ms IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553204
Vβ 14 TCR	FITC	14-2	Rat IgM, κ	Pharmingen / 553258
Vβ 17a TCR	FITC	KJ23	Ms IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553212
Straptavidin	FITC / PE / APC	-	-	Pharmingen / 554064 / 554061 / 554067

Antikörper für ELISA

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
IgM	Biotin	R6-60.2	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 53406
IgM	Purified	II/41	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553435
IgM ^a (Igh-6a)	Biotin	DS-1	Ms IgG ₁ , κ (mouse IgG ₁ ^b)	Pharmingen / 553515
IgM ^b (Igh-6b)	Biotin	AF6-78	Ms IgG ₁ , κ (mouse IgG ₁ ^a)	Pharmingen / 553519
IgG ₁	Biotin	A85-1	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553441
IgG ₁	Purified	A85-3	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553445
IgG ₁ ^a (Igh-4a)	Biotin	10,9	Ms IgG _{2a} , κ (mouse IgG _{2a} ^b)	Pharmingen / 553500
IgG ₁ ^b (Igh-4b)	Biotin	B68-2	Ms IgM, κ (mouse IgM ^a)	Pharmingen / 553533
IgG _{2a}	Purified	R11-89	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553446
IgG _{2b}	Purified	R9-91	Rat IgG ₁	Pharmingen / 553396
IgG _{2a} ^b (Igh-1b)	Biotin	5,7	Ms IgG ₃ , κ	Pharmingen / 553504
IgG _{2a/2b}	Biotin	R2-40	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553398
IgG ₃	Biotin	R40-82	Rat IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 553401
IgG ₃	Purified	R2-38	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 553404
IgD ^a (Igh-5a, Igh-5.4)	Biotin	AMS 9.1	Ms IgG _{2b} , κ (mouse IgG _{2b} ^b)	Pharmingen / 553506
IgD ^b	Biotin	217-170	Ms IgG ₁ , κ (mouse IgG ₁ ^a)	Pharmingen / 553509
IFNγ	Biotin	R4-6A2	Rat IgG ₁	Pharmingen / 551506
IFNγ	Purified	AN-18	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 551309
IL10	Biotin	JES5-16E3	Rat IgG _{2b}	Pharmingen / 554465
IL10	Purified	JES5-2A5	Rat IgG ₁ , κ	Pharmingen / 551215
IL-17	Biotin	TC11-8H4	Rat IgG ₁ , κ	eBioscience 13-7171
IL-17	Purified	TC11- 18H10.1	Rat IgG ₁ , κ	eBioscience 14-7172
IL2	Biotin	JES6-5H4	Rat IgG _{2b}	Pharmingen / 554436
IL2	Purified	JES6-1A12	Rat IgG _{2a}	Pharmingen / 554424
IL4	Biotin	BVD6-24G2	Rat IgG ₁	Pharmingen / 554390
IL4	Purified	BVD4-1D11	Rat IgG _{2b}	Pharmingen / 554387
IL5	Biotin	TRFK4	Rat IgG _{2a}	Pharmingen / 554397
IL5	Purified	TRFK5	Rat IgG ₁	Pharmingen / 554391
Osteopontin	Purified	Polyclonal	goat IgG	R&D systems BDO02
Osteopontin	Biotin	Polyclonal	goat IgG	R&D systems BAF808
TNFα	Biotin	MP6-XT3	Rat IgG ₁	Pharmingen / 554415
TNFα	Purified	G281-2626	Rat IgG ₁	Pharmingen / 551225
Streptavidin	HRP / AKP	-	-	Pharmingen / 554066 / 554065

Isotyp-Kontrollen

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
Rat IgG1 Isotyp	FITC / PE	eBRG1	Rat IgG1	eBioscience 11-4301-82/12-4301-82
Rat IgG2a,k Isotyp	FITC / PE / PerCP	R35-95	Rat IgG2a,k	Pharmingen / 554688 / 55689 / 553933
Rat IgG2a, Isotyp	APC	eBR2a	Rat IgG2a	eBioscience / 17-4321-81
Rat IgG2b,k Isotyp	FITC	A95-1	Rat IgG2b,k	Pharmingen / 556923
Rat IgG2b,k Isotyp	Purified	-	Rat IgG2b,k	Klinkert

Isotyp-Standard

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
Mouse IgM, λ	Purified	PMG1-146.1	Ms IgM, λ	Pharmingen / 550963
Mouse IgG1, λ	Purified	S1-68.1	Ms IgG1, λ	Pharmingen / 553452
Mouse IgG2a, κ (anti-TNP)	Purified	G155-178	Mouse IgG _{2a} , κ	Pharmingen / 555571
Mouse IgG _{2b} , κ	Purified	MPC-11	Mouse IgG _{2b} , κ	Pharmingen / 557351
Mouse IgG ₃ , κ (anti-KLH)	Purified	A112-3	Mouse IgG ₃ , κ	Pharmingen / 553486
Mouse IgE, κ (anti-TNP)	Purified	C38-2	Ms IgE, κ	Pharmingen / 557079

Antikörper für Immunhistologie

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
CD11b Integrin α M chain	Purified	M1/70	Rat IgG _{2a} , k	Pharmingen / 550282
CD19	Purified	1D3	Rat IgG _{2a} , k	Pharmingen / 550284
CD4	Purified	RM4-5	Rat IgG _{2a} , k	Pharmingen / 550280
CD8a	Purified	53-6.7	Rat IgG _{2a} , k	Pharmingen / 550281
Mac-3	Purified	M3 / 84	Rat IgG1, k	Pharmingen / 550292
anti bovine MBP aa82-87	Mab	3H2750	Rat IgG	US Biological / M9758-03P
Anti-Ratte IgG	Biotin	-	Rabbit	Vector Laboratories / BA - 4001

Hybridome

Spezifität	Gekoppelt	Klon	Spezies / Klasse	Vertreiber / Katalog #
GITR	Rat	DTA-1	Rat IgG2b	S. Sakaguchi
CD25	Rat	PC61	Rat (Outbred OFA) IgG1,l	S. Sakaguchi
IL-4	Rat	11B11	Rat IgG1, κ	ATCC HB-188
IFNg	Rat	R4-6A2	Rat IgG1	ATCC HB-170
MOG	Mouse	8.18C5	Mouse IgG1	C. Linnington

4.1.6 Enzyme und Kit-Systeme

Restriktionsenzyme und ihre Puffer

Enzym / Konzentration	Puffer	Temp.-Optimum	Vertreiber
<i>Bam</i> HI / (20U/μl)	<i>Bam</i> HI-Puffer add. BSA	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Bgl</i> II / (10U/μl)	Puffer 3	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Dpn</i> I / (10U/μl)	Quick-Change-Kit	37°C	Stratagene, La Jolla, CA
<i>Eco</i> RI / (10U/μl)	<i>Eco</i> RI-Puffer add. BSA	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Eco</i> RV / (10U/μl)	Puffer 3 add. BSA	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Nde</i> I / (20U/μl)	Puffer 4	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Sal</i> I / (20U/μl)	Puffer 3 add. BSA	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland
<i>Xho</i> I / (10U/μl)	Puffer 2 add. BSA	37°C	New England BioLabs ^{Inc} , Frankfurt, Deutschland

DNA-Polymerasen

Enzym / Konzentration	Temp.-Optimum	Anmerkung	Vertreiber
<i>HiFi</i> -DNA-Polymerase (5U/μl)	37°C	3'→5'-Exonuklease-Aktivität	Stratagene, La Jolla, CA
<i>Klenow</i> -Fragment (3U/μl)	RT	-	GIBCO BRL®LIFE TECHNOLOGIES, Paisley, Schottland
<i>Pfu</i> Tur-DNA-Polymerase (2,5U/μl)	68°C	3'→5'-Exonuklease-Aktivität	Stratagene, La Jolla, CA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/μl)	72°C	-	Invitrogen, Paisley, Schottland

Weitere Enzyme

Enzym / Konzentration	Puffer	Temp.-Optimum	Vertreiber
Bakterielle Alkalische Phosphatase (1U/μl)	10 x Dephosphorylierungs-Puffer	65°C	Invitrogen, Paisley, Schottland
Shrimp Alkalische Phosphatase (1U/μl)	10 x Dephosphorylierungs-Puffer	37°C	Invitrogen, Paisley, Schottland
Dnase I (1U/μl)	10xReaktionspuffer	RT	Invitrogen, Paisley, Schottland
Lysozym	Lyse-Puffer (MOG-Präparation) pH= 8	RT	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Polynukleotid-Kinase (PNK)	10 x PNK-Puffer	37°C	Invitrogen, Paisley, Schottland
Proteinase K	Puffer für Schwanzbiopsie	55°C	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Absolute QPCR-Mix	10 x QPCR-Puffer		ABgene, Hamburg, Germany
RNase I (6U/μl)	10 x Reaktionspuffer	37°C	Promega, Madison, U.S.A.
Rnase H (2U/μl)	10 x Reaktionspuffer	37°C	Invitrogen, Paisley, Schottland
RnaseOut TM (40U/μl)	10 x Reaktionspuffer	RT	Invitrogen, Paisley, Schottland
SuperScript-II-RT (50U/μl)	10 x Reaktionspuffer	42°C	Invitrogen, Paisley, Schottland

T4-DNA-Ligase (5U/ μ l)	10xReaktionspuffer	RT / 16°C	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase (5U/ μ l)	5xReaktionspuffer	RT	GIBCO BRL®LIFE TECHNO- LOGIES, Paisley, Schottland

Kit-Systeme

Bezeichnung des Kit-Systems	Hersteller
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories
DAB-Substrat-Kit	Zymed, Invitrogen, Paisley, Schottland
Vectastain-ABC-System	Vector Laboratories
Plasmid-Mini- und Midi-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNeasy-Micro-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Qiagen-Nukleotide-Removal-Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick-Gel-Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Quick-Change-Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Stratagene, La Jolla, CA
Superscript cDNA-synthese-Kit	Invitrogen, Paisley, Schottland
5'RACE-System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Invitrogen, Paisley, Schottland
HiFidelity-Kit	Stratagene, La Jolla, CA
IL-10-ELISA Kit	R&D systemsDY417
IL-17-ELISA Kit	R&D systemsDY421
TNF α -ELISA Kit	Peptotech900-K54
Dynal ® Mouse-CD4 Negative Isolation Kit	Dynal Biotech / 114,15
Dynal ® Mouse-B Cell Negative Isolation Kit	Dynal Biotech / 114,21
Anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set Intracellular staining	eBioscience / 72-5775-40

4.1.7 Nährmedien

Nährmedien für Bakterien	Zusammensetzung
LB-Medium	Sambrook et al., 1989; Für Platten wurden 1,5% Bacto-Agar zugesetzt, autoklaviert; Je nach Resistenz der kultivierten Stämme wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben : Ampicillin 100 μ g/ml Chloramphenicol 20 μ g/ml Kanamycin 50 μ g/ml

Medium für Zellkultur	Zusammensetzung
Einfriermedium	10% DMSO; 20% FCS; 70% Basalmedium (RPMI oder DMEM)
C-DMEM	10% FCS; 200 U/ml Penicillin; 200 μ g Streptomycin
I-RPMI-1640	200 U/ml Penicillin; 200 μ g Streptomycin
C-RPMI-1640	10% FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 U/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1% MEM-nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0.1 mM 2-Mercaptoethanol

4.1.8 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Aminosäuren	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumacetat	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumchlorid	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ampicillin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Aquamount	Fisher Labortechnik
Bacto-Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
DMEM, Medium für Zellkultur	Gibco, Eggenstein, Deutschland
DMSO	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Längenstandard (0.12-21.2kbp)	Roche, Penzberg, Germany
DTT	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
EDTA	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
EGTA	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Eisessig	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Ether	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Glycerin	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München, Deutschland
Glycin	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Guanidinium Chlorid	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Heparin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
His Trap Kit (Ni-NTA-Säule)	Amersham Bioscience, USA
Hi Trap Protein G Säule	Amersham Bioscience, USA
Histidin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Imidazol	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Incomplete Freud's Adjuvants	Difco, Michigan, USA
Isoamylalkohol	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
LB-Broth	MOBIO Laboratories, Inc. Dianova, Hamburg, Deutschland
LDAO, (N,N-dimethyldodecylamne-N-oxide)	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Leuzin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Mayer's Hämatoxilin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München, Deutschland
MEM-nicht-essentielle Aminosäuren 100x	Gibco
Methanol	Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Mykobakterium Tuberculosis H37 RA	Difco, Michigan, USA
Natriumacetat	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Gibco, Eggenstein, Deutschland
dNTP	Invitrogen, Paisley, Schottland
NycoPrep™ 1,077A	AXIS-SHIELD PoC As, Norwegen
Paraformaldehyd	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Pertussistoxin	LISI Biological Laboratories, USA
Phenol/Chloroform	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
PMSF	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640, Zellkultivierungsmedium	Gibco, Eggenstein, Deutschland

Protein A-Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Proteingrößenstandard	Invitrogen, Paisley, Schottland
Raffinose	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Salzsäure	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Saponin	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SDS	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Select Yeast Extract	Invitrogen, Paisley, Schottland
Streptomycin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
TCA	E.Merck AG, Darmstadt, Deutschland
TRI-Reagenz	Molecular Research Center, Inc., USA
Tris Ultra Pure	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Triton X-100	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trypanblau	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypsin / EDTA	Invitrogen, Paisley, Schottland
Tween 20	SIGMA-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

4.1.9 Puffer und Lösungen

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
Äquilibrationspuffer (MOG-Präparation)	6 M Guanidinium-Chlorid, pH 8.0
Assay-Diluent (ELISA)	1 x PBS; 10% FCS
6 x Auftragspuffer, DNA	50% (v/v) Glycerin; 0.1 mM EDTA; 0.25% (w/v) Bromphenolblau; pH 7.0
Bindungspuffer (Antikörper-Gewinnung)	20 mM Natrium-Phosphat pH 7.0
CFSE-Stock-Lösung	DMSO; 5 mM CFSE
Coating-Puffer (ELISA)	0.1 M Carbonate-Puffer, pH 9,5
Coomassie-Färbelösung	0.275% Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol und 10% Essigsäure
<i>E. coli</i> -Lysispuffer	In 1 x PBS 1 mM DTT; 0.1 mM PMSF; 0.5 mg/ml Lysozym
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0.1% SDS; pH 8.3
Elutionspuffer (Antikörper-Gewinnung)	0.1 M Glycin HCl pH 2.7
Elutionspuffer (MOG-Präparation)	6 M Guanidinium-Chlorid; 0.5 M Imidazol
Erythrozyten-Lyse-Puffer	1x PSA; 0.83% NH ₄ Cl
FACS-Färbungs-Puffer	1x PBS; 1% BSA; 0.1% NaN ₃ ;
FACS-Saponin-Puffer	1x PBS; 0.1% Saponin
FACS-PFA/Saponin-Puffer	1x PBS; 0.1% Saponin; 4% Paraformaldehyd
Heparin-Lösung	1x PBS; 5000 U/ml Heparin
Lösungs-Puffer (MOG-Präparation)	6 M Guanidinium-Chlorid; 20 mM 2-Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (MOG-Präparation)	2 x PBS; 0.5% LDAO; Lysozym
Neutralisations-Puffer (Antikörper-Gewinnung)	1 M Tris/HCl pH 9.0
Ni-NTA-Säule-Regenerations-Puffer	1% EDTA; 0.05% Tween-20
10x PBS	8.10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.47 mM NaH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2.68 mM KCl; pH 7.2
Puffer für Schwanzbiopsie	100 mM Tris HCl pH 8.5; 5 mM EDTA; 0.5% Tween 20; 1 mg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zugeben)
10x TAE	400 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2 M Eisessig; 0,01 M EDTA
TB-Puffer	10 mM Pipes; 55 mM MnCl ₂ ; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl
10xTBE	890 mM Tris/HCl pH 7.5; 890 mM Borsäure; 0.02 M EDTA
10x TE	0.1 M Tris/HCl pH 7.5; 0.01 M EDTA
2x SDS-Probenpuffer	3,4% SDS; 150 mM Tris/HCl pH 6,8; 50%(v/v) Glycerin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10% (w/v) β-Mercaptoethanol
Sonikations-Puffer (MOG-Präparation)	2 x PBS
Wasch-Puffer (ELISA)	1 x PBS; 0.05% Tween-20
Wasch-Puffer (MOG-Präparation)	6 M Guanidinium-Chlorid; 0.04 M Imidazol

4.1.10 Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller / Typ
β-Counter	Matrix 9600 Direct Beta Counter, Packard Canberra Company
Brutschränke	Heraeus, <i>BBD 6220</i> , Hanau, Deutschland
Digitalkamera	Canon
Einfrierkontainer	Nalgene, USA
ELISA-Messgerät	Victor2 TM 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer life sciences
Elektrophoresekammer	DNA : Biometra®, <i>Agagel</i> , Göttingen, Deutschland Protein : Pharmacia Biotech, <i>Mighty Small</i> ,
Elektroporationsgerät	BioRad, <i>Gene Pulser II</i> , München, Deutschland
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Paisley, Schottland
Elutip-D Minisäulen	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland (#462615)
FACS-Calibur	BD Bioscience
Fluoreszenzmikroskop	Leica, <i>Leitz DM RBE</i> ,
Geldokumentationssystem	Herolab, <i>E.A.S.Y.RH.</i> , Molekulare Trenntechnik, Wiesloch, Deutschland
Gewebehomogenisator	BD Falcon, Cell Strainer
Zell-Harvester	Micromate 196, Packard Canberra Company
Homogenisator	Braun Biotech International GmbH, Typ 8530220, Melsungen, Deutschland
Konzentratoren	Amicon, <i>Centricon</i> , Witten, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Bosch
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, <i>Axiovert 25</i> , Deutschland
Magnetthermorührer	KikAWerke, <i>RCT basic</i> , Staufen, Deutschland
Mikrotom	Leica CM3050S
Ohrklammern für Maus	H. Hauptner und Richard Herberholz GmbH & Co KG, D-42651 Solingen
pH-Meter	Mettler Toledo, <i>InLab 414</i>
Photometer	Pharmacia Biotech, <i>Ultrospec 3000</i>
Novex Tris Glycin Gele 10%	Invitrogen, Paisley, Schottland
Real-time-Thermocycler	ABI 5700 Applied Biosystems
Schüttler	Heidolph, <i>Duomax 1030</i>
Schüttleinkubatoren	<i>Certomat BS-1</i> B.Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland
Spannungsgerät	BioRad, <i>Power Pac 200</i> , München, Deutschland
Sterilfilter	Josef Peske oHG, Medizintechnischer Laborbedarf, Aindling-Pichl, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, <i>HS12</i> , Hanau, Deutschland
TissueTek OCT	Sakura Finetek
Thermocycler	BioRad, <i>Power Pac 200</i> , München, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf, <i>Thermomixer Compact</i> , Hamburg, Deutschland
Waagen	Satorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge <i>5417R</i> , Hamburg, Deutschland ; Sigma, <i>3K30</i> , B.Braun Biotech International, Osterode am Harz, Deutschland

4.1.11 Computerprogramme

Programm	Anwendung
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung
CellQuest	Aquisition und Analyse von FACS-Daten
Chromas	Auswertung von DNA-Sequenzierung
GeneAmp	Analyse von Real-Time-PCR-Daten
GraphPrism	Datenanalyse und -darstellung
Microsoft Office	Standard
Primer Express	Design von Real-time-PCR-Oligonukleotiden
WinMDI2.9	Analyse von FACS-Daten

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Präparation von DNA

4.2.1.1.1 Plasmid-Isolation aus *E. coli*

Um hochqualitative Plasmid-DNA zu erhalten, wurde das MiniPrep-Kit-System (Qiagen) verwendet. Die Isolierung großer Plasmidmengen erfolgte mit Hilfe des MaxiPrep-Kit-Systems (Qiagen). Beide Systeme beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Es wurde nach den jeweiligen Anweisungen des Herstellers verfahren.

4.2.1.1.2 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, unter Verwendung des Gelextraction-Kit-Systems (Qiagen) aufgereinigt und schließlich in entsprechender Menge destillierten Wassers aufgenommen.

4.2.1.1.3 Präparation von DNA zur Pronukleusinjektion

1.) Restriktionsverdau: Ca. 25 µg sehr saubere (Qiagen Kit) Plasmid-DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzym(en) vollständig gespalten. Der Verdau wurde am Ende auf Vollständigkeit kontrolliert.

2.) Gelelektrophorese: In einer sauberen Gelkammer wurde ein 0,8% Agarosegel mit 1 µl Ethidiumbromidlg./100 ml (10% der Standardmenge) angesetzt. Dazu wurde ein präparativer Kamm mit mind. 5 cm breiter Tasche verwendet (bzw. mehrere Taschen zu einer breiten verklebt). Wegen Kontaminationsgefahr wurde kein Größenmarker verwendet.

3.) Elektroelution: Nach der vollständigen Abtrennung wurden die Konstrukte mit einem Skalpell als schmaler Block ausgeschnitten (UV-Schirm 320 nm, niedrige Intensität) und in einen Dialyseschlauch überführt, dieser mit Laufpuffer gefüllt und mit Klammern verschlossen. Der Dialyseschlauch wurde quer zur Laufrichtung in der Laufkammer fixiert, z.B. mit einer Glasplatte als Gewicht, und die Elektrophorese wurde für ca. 1 Std. bei 80 Volt Spannung fortgesetzt. Dann wurde die Laufrichtung für ca. 30 s mehrfach umgepolt, um die eluierte DNA von der Wand des Dialyseschlauchs in die freie Lösung zu lenken. Der Erfolg der Elution wurde unter UV-Licht kontrolliert – die DNA sollte zu 80-90% aus dem Agaroseblock eluiert haben – sonst wurde die Elution fortgesetzt. Die eluierte DNA wurde in ein frisches Falcon überführt, indem die DNA-Lösung mit einer 5 ml Spritze aus dem Dialyseschlauch absaugt wurde.

4.) Aufarbeitung der DNA-Lösung: Die Aufarbeitung erfolgte mit Elutip-D-Minicolumns von Schleicher&Schüll. Die Elutip-D-Säulen wurden mit 5 ml *Niedrig Salz Puffer* äquilibriert. Dafür wurde die Spitze der Säule auf halber Höhe abgeschnitten, die Schutzkappe entfernt, die Spritze aufgesetzt und der Puffer mit 0,5-1,0 ml pro Minute durchgedrückt. (Hinweis: Eine frühzeitige Äquilibration ein bis zwei Std. vor Einsatz der Säule erhöht die Ausbeute.) Die DNA-Lösung aus der Elektroelution wurde 1/2 mit *Niedrig Salz Puffer* verdünnt und das Gemisch über eine Spritze mit einer Flussrate von 1 ml/min (1 Tropfen pro Sekunde) an die Säule adsorbiert. Anschließend wurde die Säule 2x mit je 3,0-5,0 ml *Niedrig Salz Puffer* gewaschen. Daraufhin wurde die DNA mit 400 µl *Hoch Salz Puffer* in ein Eppendorf-Gefäß eluiert und mit 1,0 ml Ethanol präzipitiert. Die pelletierte DNA wurde dann 3x mit eiskaltem 70% EtOH gewaschen und vorsichtig getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in einem kleinen Volumen (25-50 µl) *Injektionspuffer* gelöst. Das kleine Volumen war erforderlich, um eine genügend hohe, im Photometer eindeutig messbare Konzentration zu gewährleisten. Die DNA-Konzentration wurde dann im Photometer bestimmt und anschließend auf 100 ng/µl eingestellt. Das DNA-Fragment wurde dann auf einem Agarosegel mit standardisierter DNA bekannter Konzentration als Referenz kontrolliert (siehe Abb. 4.1). Dies diente der Konzentrationsbestimmung und der Kontrolle des Fragments auf Intaktheit und Reinheit.

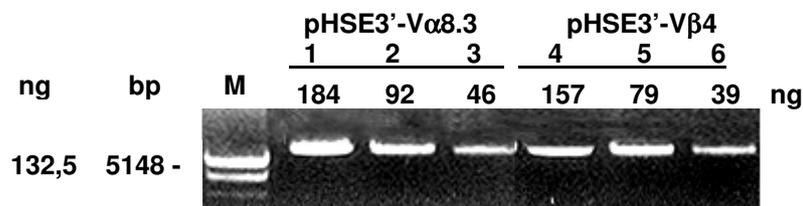


Abbildung 4.1:

Agarose-Gelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der *Xho*I-linearisierten pHSE3'-Vα8.3- und pHSE3'-Vβ4-Konstrukte für die Mikroinjektion zur Generation TZR-C3-transgener Mäuse.

Definierte Mengen der aufbereiteten, *Xho*I-behandelten Konstrukte von pHSE3'-Vα8.3 und Vβ4 wurden mit einem DNA-Längenstandard (λ DNA behandelt mit *Hind*III & *Eco*R1) auf einem 1% Agarosegel analysiert. (M) entspricht dem DNA-Längenstandard; (1)-(3) pHSE3'-Vα8.3; (4)-(6) pHSE3'-Vβ4. Zahlen in den jeweiligen Spuren entsprechen der aufgetragenen DNA-Menge in ng.

Niedrig Salz Puffer: 0,2 M NaCl; 20 mM TrisHCl; 1,0 mM EDTA, pH 7,4

Hoch Salz Puffer: 1,0 M NaCl; 20 mM TrisHCl; 1,0 mM EDTA, pH 7,4

(Hinweis: Für Fragmente >10 kb kann die Konzentration auf bis zu 2,0 M NaCl erhöht werden)

Injektionspuffer: 10 mM Tris; 0,2 mM EDTA; pH 7,5 in steril filtriertem Wasser

4.2.1.1.4 Ergebnis der Pronukleusinjektion zur Herstellung TZR-C3-transgener Tiere

Die Pronukleusinjektion wurde von der „Transgenen Service“-Einrichtung der Max-Planck-Institute für Biochemie und Neurobiologie unter Anleitung von Dr. M. Bösl durchgeführt. Die pHSE3'-V α 8.3- und pHSE3'-V β 4-Konstrukte wurden gleichzeitig in drei verschiedenen DNA-Mengen (je 1 ng; 1.5 ng oder 2 ng) in befruchtete Eizellen von FVB-Mäusen mikroinjiziert und in scheinchwangere Ammen-Mäuse transferiert. Insgesamt wurden 82 Tiere geboren, die mittels PCR auf einer Schwanzbiopsie getestet wurden, ob sie transgen für die TZR-C3-Konstrukte waren. Um positive Mäuse identifizieren zu können, wurde zunächst eine PCR-„Screening-Methode“ entwickelt. Diese und exemplarische Resultate aus der Identifizierung TZR-C3-transgener Tiere sind in Mat. & Meth. Abb. 4.1 dargestellt. Alle positiv getesteten Tiere (13 V α ⁺/V β ⁺ und 2 nur V β ⁺) wurden mit SJL/J-Wt-Tieren zur Verpaarung angesetzt und die F1-Generation daraus analysiert, um festzustellen, wie viele Tiere die transgenen TZR-C3-Konstrukte in der Keimbahn trugen. Nach abgeschlossener Identifizierung TZR-C3-transgener F1-Tiere konnte ermittelt werden, welche DNA-Mengen (je 1 ng; 1.5 ng oder 2 ng) der pHSE3'-V α 8.3- und pHSE3'-V β 4-Konstrukte am effizientesten war, um positive TZR-C3-transgene Tiere zu generieren (Tab. 4.2).

Mikroinjektion	Founder	V α 8.3 ⁺	V β 4 ⁺	F1 positiv?	Founder / Anzahl der Tiere
1 ng + 1 ng	# 1568	+	+	nein	V α 8.3 ⁺ V β 4 ⁺ : 8,0% (2 von 25) V β 4 ⁺ : 4,0% (1 von 25) → kein Keimbahn-positiver Founder
	# 1569		+	nein	
	# 1571	+	+	nein	
1.5 ng + 1.5 ng	# 1586	+	+	ja	V α 8.3 ⁺ V β 4 ⁺ : 14,3% (4 von 28) V β 4 ⁺ : 3,5% (1 von 28) → 1 Keimbahn-positiver Founder
	# 1590	+	+	nein	
	# 1600	+	+	nein	
	# 1604	+	+	nein	
	# 1605		+	nein	
2 ng + 2 ng	# 1613	+	+	ja	V α 8.3 ⁺ V β 4 ⁺ : 24,1% (7 von 29) → 6 Keimbahn-positiv Founder
	# 1615	+	+	nein	
	# 1618	+	+	ja	
	# 1621	+	+	ja	
	# 1635	+	+	ja	
	# 1639	+	+	ja	
	# 1640	+	+	ja	
Insgesamt					V α 8.3 ⁺ V β 4 ⁺ : 15,8% (13 von 82) V β 4 ⁺ : 2,4% (2 von 82) → 7 Keimbahn-positiv Founder

Tabelle 4.2:
Anzahl der Keimbahn-positiven TZR-C3-transgenen Tiere nach Injektion verschiedener DNA-Mengen von pHSE3-V α 8.3 und pHSE3-V β 4

Aus der Mikroinjektion von je 1 ng pHSE3'-V α 8.3 und -V β 4 entstanden insgesamt 25 Tiere, von denen 2 positiv für beide transgene Konstrukte und eines nur für V β 4 positiv waren. Kein einziges Tier war Keimbahn-positiv. Aus der Mikroinjektion von je 1.5 ng pHSE3'-V α 8.3 und -V β 4 entstanden 28 Tiere, von denen 4 positiv für beide transgene Konstrukte und eines nur für V β 4 positiv waren. Von den 5 positiven Foundern war nur der Founder #1586 Keimbahn-positiv. Aus der Mikroinjektion von je 2 ng pHSE3'-V α 8.3 und -V β 4 entstanden 7 doppelt-positiv Founder, von denen 6 Keimbahn-positiv für beide Konstrukte waren: #1613, #1618, #1621, #1635, #1639 und #1640. Somit war die 2-ng-Injektion am effizientesten für die Herstellung TZR-C3-transgener Tiere.

4.2.1.1.5 Gewinnung genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie

Das Schwanzgewebe der Maus (<0,5 cm) wurde in einem Eppendorfgefäß mit 0,5 mL *Puffer für Schwanzbiopsie* bei 55°C über Nacht (bzw. mind. 4 Std.) schüttelnd inkubiert. Das Gewebe sollte vollständig aufgelöst sein und einige unverdaute Reste und Haare am Boden des Eppendorfgefäßes sein. Dann wurde 0,5 ml Phenol/Chloroform zugegeben, gevortext und bei RT und 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe von 1 ml EtOH und dreibis viermaliges Invertieren des Eppendorfgefäßes gefällt. Mit einer Pipettenspitze wurde die ausgefällte DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches 0,5 ml 10 mM TrisHCl pH 8,0 enthielt. War die DNA-Ausbeute zu gering, um sichtbar auszufallen, konnte sie durch Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm für 2 min pelletiert werden. Das Lösen der DNA erfolgte während der anschließenden Inkubation bei 55°C auf einem Schüttler.

Puffer für Schwanzbiopsie: 100 mM TrisHCl; pH8,5; 5 mM EDTA; 200 mMNaCl; 0,5% Tween 20 und 1 mg/ml Proteinase K (frisch zugeben)

4.2.1.2 **Präparation von RNA**

4.2.1.2.1 Präparation von RNA aus T-Zellen

Bei der Präparation von RNA war darauf zu achten, nur autoklavierte und RNase-freie Reagenzien zu verwenden. 1 bis 2×10^6 Antigen-stimulierte T-Zellen wurden bei 4°C und 12.000 rpm für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 0,5 ml TRI-Reagenz und 0,1 ml Chloroform aufgenommen, gevortext und bei RT 5 min inkubiert. Dann wurden sie zentrifugiert (4°C; 12.000 rpm; 15 min), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und die RNA durch mehrmaliges Invertieren des Eppendorfgefäßes gefällt. Anschließend wurde die gefällte RNA durch Zentrifugation (4°C; 12.000 rpm; 8 min) pelletiert, der Isopropanol vorsichtig abpipettiert und 0,4 ml 70% EtOH zugegeben. Erneut wurde zentrifugiert (4°C, 7500 rpm; 5 min), der EtOH abpipettiert und die RNA getrocknet, indem das Eppendorfgefäß über Kopf bei RT 5 min gelagert wurde. Anschließend wurde die isolierte RNA in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

4.2.1.2.2 Präparation von RNA aus Organen

Um RNA aus Organen zu präparieren, wurden diese in 0,5 bis 2,0 ml TRI-Reagenz homogenisiert und anschließend wie oben beschrieben fortgefahren, indem die Mengen der eingesetzten Reagenzien entsprechend angepasst wurden.

4.2.1.2.3 Präparation von RNA aus peripheren Blutzellen

Für die Präparation von RNA aus peripheren Blutzellen wurde das RNeasy-Micro-Kit-System (Qiagen) verwendet. 100-200 µl, durch retro-orbital Punktion entnommenes Blut wurden mit 100 µl Heparinlösung (5000 U/ml) vermischt, um die Blutgerinnung zu vermeiden. Die Präparation der RNA erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers.

4.2.1.3 *cDNA-Synthese*

1.) DNaseI-Verdau: Um die RNA einer cDNA-Synthese zu unterziehen, musste zunächst ein DNaseI-Verdau durchgeführt werden, um Reste genomischer DNA aus der RNA-Präparation zu entfernen. Dies erfolgte gemäß den Vorschriften des Herstellers. Pro µg RNA wurde 1 U DNaseI zum Ansatz gegeben und bei RT 30 min inkubiert. Die anschließende Zugabe von EDTA sowie die Inkubation bei 65°C für 15 min inaktivierten die DNaseI.

2.) cDNA-Synthese: Die cDNA-Synthese wurde mit sog. Random-Hexamer-Oligonukleotid-Primern und der Reversen-Transkriptase-SuperScriptII RT durchgeführt. Random-Hexamer-Primer werden dann verwendet, wenn die Gesamtheit der RNA-Moleküle einer Präparation unspezifisch in cDNA konvertiert werden soll. Gemäß den Vorschriften des Herstellers wurde zunächst die DNaseI-behandelte RNA mit Nukleotiden und den Random-Hexamer-Primern bei 65°C 5 min inkubiert, um die RNA zu denaturieren und die Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen. Anschließend erfolgte bei 42°C für 50 min die cDNA-Synthese mittels SuperScriptII-RT in Anwesenheit des Ribonuklease-Inhibitors RNaseOUT, um das RNA-Template zu schützen. Abschließend wurde die eingesetzte RNA durch Zugabe von RNaseH verdaut, um in der anschließenden PCR-Reaktion die Sensitivität gegenüber der synthetisierten cDNA zu erhöhen.

4.2.1.4 *Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA*

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurde im Spektralphotometer (Pharmacia Biotech, *Ultrospec 3000*) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm durchgeführt. Gemessen wurde in Quarzküvetten bei einer Verdünnung von 1:50 gegen destilliertes Wasser als Nullwert. Die Berechnung der Konzentration c (mol/l) aus der ermittelten Absorption, OD-Wert, erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = OD_{260nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}$$

In diesem Fall entspricht d der Dicke der Quarzküvette ($d=1$ mm) und ϵ dem molaren

Absorptionskoeffizienten (Dimension $L \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$). Für DNA ergibt sich unter diesen Bedingungen ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ bzw. für RNA von $\epsilon = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Verunreinigungen der Probe durch Proteine konnten durch zusätzliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ identifiziert werden. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ verringert sich mit zunehmender Verunreinigung der Probe mit Proteinen und beträgt bei sehr reiner DNA oder RNA $\geq 2,0$.

4.2.1.5 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurde von der Sequenzier-Abteilung des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie durchgeführt. Für die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse wurden das Computerprogramm Chromas sowie die BLAST-Funktionen von NCBI verwendet.

4.2.1.6 Enzymatische Behandlung von DNA

4.2.1.6.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in beiden Strängen einer DNA-Doppelhelix innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiesterbindungen spalten können. Die Spaltung von DNA mit diesen Enzymen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Pro μg Plasmid-DNA wurden 2,5 U Enzym eingesetzt und bei 37°C 2 Std. inkubiert. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, dass die eingesetzte Enzymmenge 10% des Gesamtvolumens nicht überschritt. Mehrfachspaltungen wurden, wenn möglich, in einem Puffer durchgeführt. Anderenfalls wurde die DNA zwischen den Spaltungen mit dem Nucleotide-Removal-Kit-System (Qiagen) gereinigt.

4.2.1.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die intramolekulare Ligation von DNA-Fragmenten zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase entfernt. Die Dephosphorylierung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Pro pmol DNA wurde 0,5U Enzym dem Restriktionsansatz zugesetzt und bei 65°C 1 Std. inkubiert.

4.2.1.6.3 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxyl-Gruppe. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die Ausbildung von

Vektor-Konkatameren zu minimieren bzw. zu vermeiden, wurde das Fragment im Überschuss zum Ligationsansatz gegeben (Insert: Vektor=3:1 bis 10:1), wobei 10 bis 50 ng Vektor-DNA eingesetzt wurden. Der Ligationsansatz wurde bei RT 2 Std. inkubiert. Um die einzusetzenden Volumina von Vektor und Insert zu bestimmen, wurden die Konzentrationen der Ligationspartner mittels Agarose-Gelelektrophorese neben einem DNA-Mengenstandard abgeschätzt. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurden 10 µl des Ansatzes in *E. coli*-Zellen transformiert. Um die Religationsrate des Vektors zu kontrollieren, wurde neben dem Vektor-Insert-Ligationsansatz noch ein weiterer Ligationsansatz nur mit Vektor-DNA als Negativkontrolle angesetzt.

4.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungs-, Mutagenese- oder Analysezwecke diente die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). DNA-Fragmente können *in vitro* durch thermostabile DNA-Polymerasen vervielfältigt werden (Saiki et al., 1988). Die Amplifikation erfolgt über zwei gegensätzlich orientierte Oligonukleotid-Primer. Diese hybridisieren mit den denaturierten Einzelsträngen der zu amplifizierenden DNA und dienen der DNA-Polymerase als Ansatzstelle zur Synthese. Die PCR-Reaktion, in der cDNA oder genomische DNA als Matrize verwendet wurden, wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1x	DNA	0,5-1 µl
	10x Puffer	2,0 µl
	Primer (10 µM)	1,0 µl
	Primer (10 µM)	1,0 µl
	dNTP (à 2,5 mM)	1,0 µl
	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
	H₂O	add
		Σ 20 µl

Folgende Zyklen wurden für die Amplifikation der DNA-Fragmente im PCR-Gerät (BioRad, *Power Pac 200*, München, Deutschland) durchgeführt.

1x	Denaturierung	95°C	5 min
35x	Denaturierung	95°C	45s
	Hybridisierung (T _H)		45s
	Polymerisation	72°C	60s
1x	Polymerisation	70°C	2 min

Die Hybridisierungstemperatur (T_H) wurde 4°C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide gewählt (Suggs et al., 1981). Es wurden 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

4.2.1.8 Identifizierung TZR-C3-transgener Mäuse

Um transgene Mäuse identifizieren zu können, wurde eine PCR „Screening-Methode“ entwickelt. Diese und exemplarische Resultate aus der Identifizierung TZR-C3-transgener Tiere sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

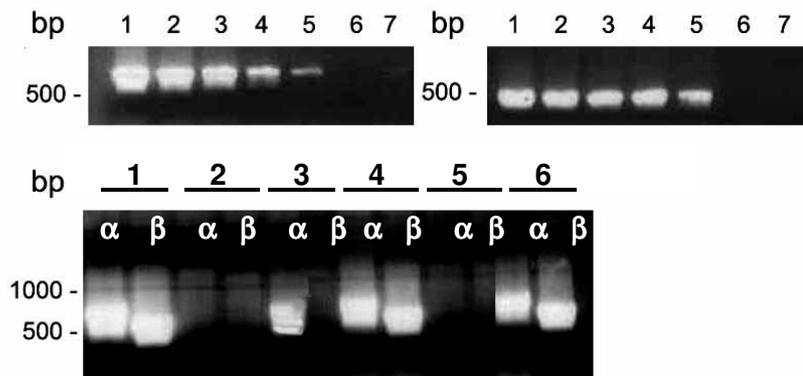


Abbildung 4.3:

Agarose-Gelelektrophorese zur Identifizierung TZR-C3-positiver Founder

(A) Etablierung der TZR-V α 8.3-PCR (Primer: mTZR-V α 8.3-CDR3 seq. sense und hu β -Globin-as #1);

Spur (1) bis (5) beinhalten PCR-Produkte mit dem Plasmid pHSE3'-TZR-V α 8.3 als Template (1) 100 pg; (2) 10 pg; (3) 1 pg; (4) 0.1 pg und (5) 0.01 pg; Spur (6) Wasserkontrolle und (7) 100 pg pHSE3'-TZR-V β 4 als Negativkontrolle; die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug 681 bp.

(B) Etablierung der TZR-V β 4 PCR (Primer: PH-2Kb sense #1 und TZR-V β 4-CDR3 seq. As);

Spur (1) bis (5) beinhalten PCR-Produkte mit dem Plasmid pHSE3'-TZR-V β 4 als Template (1) 100 pg; (2) 10 pg; (3) 1 pg; (4) 0.1 pg und (5) 0.01 pg; (6) Wasserkontrolle und (7) 100 pg pHSE3'-TZR-V α 8.3 als Negativkontrolle; die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug 542 bp.

(C) PCR mit genomischer DNA aus einer Schwanzbiopsie von TZR-C3-doppelt-positiven Foundern (1) #1613, (4) #1618 und (6) #1621; einem nur TZR-V α 8.3-positiven (3) #1615; TZR-C3-negative Founder in Spur (2) #1614 und (5) #1620; Produkte der TZR-V α 8.3-PCR (rechte Spur) und TZR-V β 4-PCR (linke Spur) desselben Tieres wurden nebeneinander aufgetragen; die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1% Agarosegel; Die Größen des DNA-Längensstandards sind am linken Bildrand angegeben.

4.2.1.9 Transformationskontrolle in *E. coli* mit PCR

Zur schnellen Überprüfung, ob ein DNA-Fragment erfolgreich in einen Vektor kloniert wurde, konnten die erhaltenen *E. coli*-Klone mit Hilfe der PCR direkt analysiert werden. Hierzu wurden von Zellen der Klone mit einem sterilen Zahnstocher ein Abstrich auf eine neue Selektivplatte vorgenommen und dann in das vorbereitete PCR-Reaktionsgefäß abgetupft. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den oben beschriebenen. Zur anschließenden Analyse der PCR-Produkte wurde 1/6 des Reaktionsansatzes mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.2.1.10 Real-time-PCR

Für die Expressionsanalyse einer bestimmten mRNA mittels Real-time PCR wurden zunächst mit dem Programm Primer Express ein Oligonukleotidpaar sowie eine Fluorochrom-markierte Oligonukleotid-Probe (5'-Fam; 3'TAMRA) entworfen und von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert. Jede Oligonukleotid-Proben-Kombination wurde im Triplikat analysiert, wobei je 0,33 µl cDNA als Template eingesetzt wurde. Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers (ABgene) angesetzt und im Thermocycler ABI 5700 (Applied Biosystems) analysiert. Die erhaltenen Werte für das Expressionsniveau einer bestimmten mRNA wurden jeweils mit der für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenzwert normalisiert. Die erste Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der GeneAmp5700 Software von PE Biosystems.

4.2.1.11 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wandert in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol. DNA-Fragmentgemische können deshalb durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt werden, was die Analyse ihrer Größe anhand des aufgetragenen Längenstandards möglich macht. Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe von 0,1 bis 10 kb Länge wurden Agarose-Flachbettgele (Biometra®, *Agagel*, Göttingen, Deutschland) mit einer Agarosekonzentration von 0,7 bis 1,4% eingesetzt. Hochprozentige Agarosegele trennen besser kleine, niederprozentige Gele eignen sich besser für die Auftrennung von größeren Fragmenten. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit Auftragspuffer versetzt. Bei analytischen Gelen betrug die angelegte Spannung 120 V und bei präparativen Gelen 80 V.

6x Auftragspuffer: 50% (v/v) Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; pH 7,0
10xTAE: 400 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,2 M Eisessig; 0,01 M EDTA
Ethidiumbromidstock c= 10 mg/ml

Die Elektrophorese von RNA verläuft nach demselben Prinzip wie bei der DNA-Elektrophorese, aber da RNA-Moleküle starke Sekundärstrukturen ausbilden, wurde ein denaturierendes Gelsystem verwendet. Die RNA wird mit dem *5xRNA-Probenpuffer* vermischt, bei 80°C 2 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und bei 125 V für 1 Std. im RNA-Gel aufgetrennt.

100ml RNA-Gel: 1,2 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer; 2 % Formaldehyd; 5 µl Ethidiumbromid
RNA-Laufpuffer: 1xMOPS
5xRNA-Probenpuffer: 16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung; 720 µl 37%-iges Formaldehyd; 80 µl 500mM EDTA (pH 8); 2 ml 100 % Glycerol; 3084 µl Formamid; 4 ml 10 x MOPS; auf 10 ml mit DEPC-Wasser auffüllen (3 Monate bei 4°C haltbar)
MOPS: 200 mM 4-Morpholinopropansulfonsäure; 50 mM NaAc, 10 mM EDTA; pH 7,0

4.2.1.12 Visualisierung von DNA und RNA

Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten DNA- oder RNA-Banden des Gels durch Fluoreszenzanregung mit UV-Licht ($\lambda = 260 \text{ nm}$) sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert unspezifisch zwischen die Basen der DNA und RNA. Die Dokumentation erfolgte mit einem Video-System (Herolab, E.A.S.Y.R.H., Molekulare Trenntechnik, Wiesloch, Deutschland). Ein mit der Probe aufgetragener DNA-Größenstandard ermöglichte es, DNA-Fragmenten ihre Länge zuzuordnen.

4.2.1.13 Generation von Punktmutanten mit dem Quick-ChangeTM-Site-Directed-Mutagenesis-Kit

Dieses Kit-System von Stratagene® wurde zur Einführung von definierten Punktmutanten in Plasmiden verwendet. Das Mutagenese-System beruht auf der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die eine gewünschte Mutation tragen und zu je einem Strang des Ausgangsplasmids komplementär sind. In der PCR werden die Oligonukleotid-Primer und damit die veränderten Basen in die neu-synthetisierten Plasmide eingebaut. Im Anschluss an die Amplifikations-Reaktion wird der Ansatz mit dem Restriktionsenzym *DpnI* inkubiert. *DpnI* spaltet doppelsträngige DNA nur, wenn das Alanin methyliert vorliegt. Die Versuchsdurchführung ist dem Benutzer-Handbuch zu entnehmen.

4.2.1.14 Klonierungsstrategie für die Herstellung der transgenen pHSE3'-V α 8.3- und pHSE3'-V β 4-Konstrukte

Für die transgene Expression sollten die TZR-Ketten in den pHSE3'-Vektor kloniert und dieser dann über Restriktionsverdau mit *XhoI* linearisiert werden. Der genaue Aufbau der pHSE3'-Expressions-Kassette nach Pircher et al. (1993) mit den subklonierten V α 8.3- und V β 4-Ketten ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Deshalb durfte in den TZR-Ketten selbst keine *XhoI*-Schnittstelle vorhanden sein. Die Sequenzierung der V β 4-Kette ergab, dass sich eine *XhoI*-Schnittstelle vorhanden sein. Die Sequenzierung der V β 4-Kette ergab, dass sich eine *XhoI*-Schnittstelle in der C β -Region (As 115-116) befand. Deshalb wurde diese *XhoI*-Schnittstelle in der V β 4-Kette mit Hilfe des Quick-Change-Site-Directed-Mutagenesis-Kit-Systems entfernt. Die eingeführte Punktmutation, (gag zu gaa), ließ das Glutamat an As-Position 116 unverändert, entfernte aber die *XhoI*-Schnittstelle und generierte zugleich eine neue für das Restriktionsenzym *BglIII*. So konnte die eingeführte Mutation zusätzlich über Restriktionsverdau kontrolliert werden. Abbildung 4.4 zeigt die Strategie der eingeführten Punktmutation in die V β 4-Kette.



Abbildung 4.4:

Mutations-Strategie für die Entfernung der *XhoI*-Schnittstelle in der $V\beta 4$ -Kette

Mit Hilfe des Quick-Change-Site-Directed-Mutagenese-Kit-Systems und der Primer mTCRV $\beta 4$ *XhoI*Mutsense / *BglII* und mTCRV $\beta 4$ *XhoI*Mutas / *BglII* konnte die *XhoI*-Schnittstelle an Position 115.-116. As in der $V\beta 4$ -Kette entfernt werden. Zugleich wurde eine *BglII*-Schnittstelle eingeführt, so dass der Erfolg der Mutagenese über Restriktions-Verdau kontrolliert werden konnte.

Nachdem die *XhoI*-Schnittstelle aus der Sequenz der $V\beta 4$ -Kette entfernt worden war, wurden die vollständigen $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -cDNAs einzeln in den pHSE3'-Vektor kloniert, in dem die transgenen TZR-Konstrukte schließlich in der Maus zur Expression kommen sollten. Die Klonierungsstrategien für die $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -cDNAs aus dem pBluescript-Vektor in den Expressionsvektor pHSE3' sind in Abbildung 4.5 dargestellt.

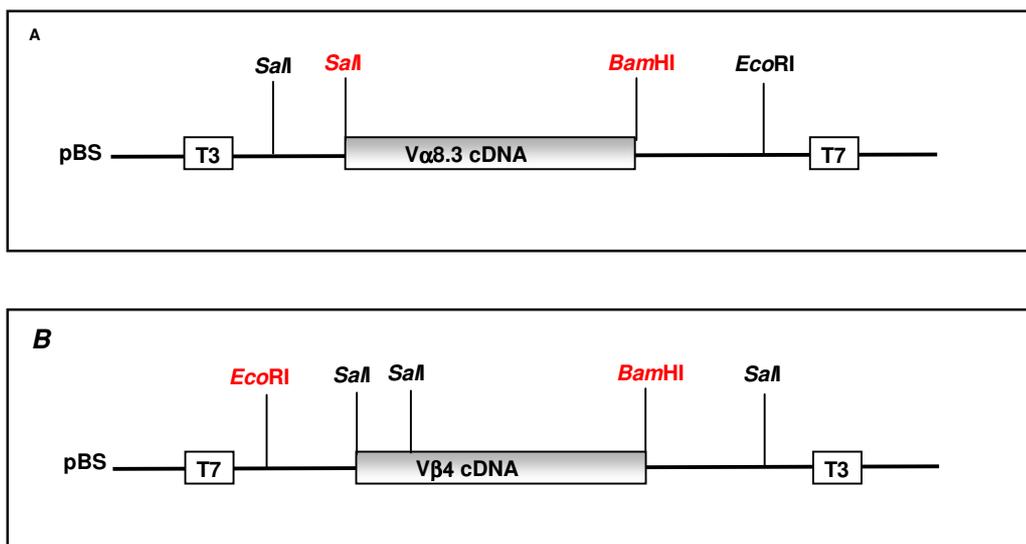


Abbildung 4.5:

Klonierungsstrategie für die $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Kette vom pBluescript-Vektor in pHSE3'

Die schematische Darstellung zeigt die Orientierung der (A) $V\alpha 8.3$ -Sequenz (Klon HiFi#4) bzw. in (B) die $V\beta 4$ -Sequenz (Klon Pfu#1 Quick-Change #3) im pBluescript-Vektor mit den vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Die in Rot dargestellten Schnittstellen für die Enzyme (A) *SalI* und *BamHI* innerhalb der Sequenz der $V\alpha 8.3$ -Kette wurden dazu verwendet, diese cDNA in den pHSE3-Vektor zu klonieren. (B) Für die Klonierung der $V\beta 4$ -Kette in pHSE3' wurde auf die *BamHI*-Schnittstelle der klonierten cDNA und auf die *EcoRI*-Schnittstelle des pBluescript-Vektors zurückgegriffen.

Die $V\alpha 8.3$ -cDNA (pBS-HiFi Klon #4) wurde über die *SalI*- und *BamHI*-Schnittstellen gerichtet in pHSE3'-Vektor kloniert (siehe Abb. 4.5 (A)). Für die $V\beta 4$ -Kette (pBS- $V\beta 4$ -Pfu Klon #1 Quick-Change Klon #3) musste auf die *SalI*-Schnittstelle verzichtet werden, da die $V\beta 4$ -Sequenz selbst eine *SalI*-Schnittstelle besaß (As-Pos. 20). Deshalb wurde auf die 5'- von

der V β 4-cDNA im pBluescript-Vektor gelegenen *EcoRI*-Schnittstelle zurückgegriffen, mit dem Enzym *EcoRI* gespalten, die Schnittstelle anschließend glatt gemacht und dann mit *BamHI* geschnitten. Die so behandelte V β 4-cDNA wurde anschließend in einen vorbereiteten pHSE3'-Vektor kloniert, der ebenfalls ein glattes und ein mit *BamHI* geschnittenes Ende hatte. Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der TZR-Konstrukte in den pHSE3'-Vektor wurden beide TZR-Inserts sowie die 5'- und 3'-Übergänge der TZR-Inserts zum pHSE3'-Vektor sequenziert.

4.2.2 Biochemische Methoden

4.2.2.1 Rekombinate Herstellung der extrazellulären Domäne von MOG, MOG₁₋₁₂₅, in *E. coli*-, „Inclusion bodies“

200 µl des *E. coli*-Glycerolstocks mit dem Expressionsplasmid pQE-MOG₁₋₁₂₅ (Amor et al., 1994) wurden in einer Vorkultur (1,2 L für 12 L Gesamtkultur), *LB-Medium* mit den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin (Endkonz. 100 mg/ml und 25 mg/ml) mit 1% Glukose, ü.N. angezogen.

Am nächsten Tag wurden die Zellen pelletiert (4°C; 4000 rpm; 15 min), in 10 ml *LB-Medium* resuspendiert und je 1 ml davon in 2 L *LB-Medium* mit oben genannten Antibiotika überführt und die Kulturen bis zu einer OD_{600nm}<0,7 geschüttelt (ca. 3 Std.). Dann wurde jeder Kultur IPTG (Endkonz. 1 mM) zugegeben und bis zu einer OD_{600nm} ca. 1,3 weiter inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (4°C; 7000 rpm; 20 min), in *Sonifikationspuffer* aufgenommen und noch einmal damit gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Am darauf folgenden Tag wurde das Pellet in 50 ml *Sonifikationspuffer* mit 0,5% LDAO (Lauryl-dimethyl-N-aminoxid) und 1 g Lysozym gevortext, der pH-Wert (ca. pH 8,0) gemessen und die Suspension drei mal 5 min sonifiziert. Dann wurde erneut zentrifugiert (4°C; 20.000 rpm; 20 min) und das Pellet, welches die „Inclusion bodies“ enthielt, in 60 ml *Waschpuffer I* aufgenommen, das Pellet in einem Potter gründlich homogenisiert und zentrifugiert (4°C; 20.000 rpm; 15 min). Homogenisation und Waschen wurden insgesamt dreimal wiederholt und schließlich das LDAO durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Dann wurde das Pellet in *Solubilisierungspuffer* (10 ml Puffer/g Pellet) aufgenommen und bei RT 15 min inkubiert. Entsprechend den Vorschriften des Herstellers wurde eine His-Trap-Ni-NTA-Säule (Amersham Bioscience) vorbereitet, über die das hergestellte MOG₁₋₁₂₅ gereinigt werden sollte, da es einen N-terminalen His-Tag besaß. Dazu wurde die Suspension 1/10 mit 6 M Guanidiniumchlorid (ca. 500 ml) versetzt und ü.N. auf die Ni-NTA-Säule geladen. Die Säule wurde dann mit *Waschpuffer II* so lange gewaschen, bis das an die Säule angeschlossene UV-Messgerät anzeigte, dass das Basalniveau wieder erreicht war, d.h. alle nichtgebundenen Proteine von der Säule abgewaschen waren. Schließlich wurde das an die Säule gebundene MOG₁₋₁₂₅ mit Hilfe des *Elutionspuffers* von der Säule gelöst und der Erfolg der Elution mit dem UV-Messgerät kontrolliert. Da MOG₁₋₁₂₅ in PBS präzipitiert, wurde es gegen 5 L 20 mM Natriumacetat pH 3,0 dialysiert und bis zu einer Konzentration von 2-2,5 mg/ml konzentriert. Wenn MOG₁₋₁₂₅ in der Zellkultur verwendet werden sollte, wurde es gegen 5 L 20 mM Natriumacetat mit pH 5,0 dialysiert und dann nur bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml konzentriert, um eine Präzipitation zu vermeiden.

<i>LB-Medium:</i>	10 g Pepton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl in destilliertem Wasser pro Liter
<i>Sonifaktionspuffer:</i>	2xPBS
<i>Waschpuffer I:</i>	2xPBS; 0,5% LDAO
<i>Solubilisierungspuffer:</i>	6 M Guanidiniumchlorid mit 20 mMβ-Mercaptoethanol; pH 8,0
<i>Waschpuffer II:</i>	6 M Guanidiniumchlorid; 40 mM Imidazol; pH 6-7
<i>Elutionspuffer:</i>	6 M Guanidiniumchlorid; 500 mM Imidazol; pH 6-7

4.2.2.2 Reinigung von Antikörpern

Die Antikörper-produzierenden Hybridome wurden in „Cell Stack“-Systemen (Corning) in C-DMEM Medium gezogen, der Überstand gesammelt, steril filtriert und an eine PBS-äquilibrierte Hitrap-Protein-G-Säule (Amersham Bioscience) gebunden. Die Säule wurde mit 20 ml *Bindungspuffer* gewaschen und der Antikörper dann mit *Elutionspuffer* von der Säule eluiert und sogleich in *Neutralisationspuffer* aufgenommen. Vor seiner Verwendung wurde der Antikörper gegen 1l PBS pH 7,4 ü.N. dialysiert, steril filtriert und die Konzentration bestimmt.

<i>Bindungspuffer:</i>	20 mM Natriumphosphat pH 7,0
<i>Neutralisationspuffer:</i>	1 M Tris-HCl pH 9,0
<i>Elutionspuffer:</i>	0,1 M Glycin-HCl pH 2,7

4.2.2.3 Proteinquantifizierung nach Bradford (1976)

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Extinktionsmaximum einer sauren Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung von 465 nm auf 595 nm ansteigt, wenn ein Protein an das Farbe-Reagenz bindet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde 1 µl Probe zusammen mit 799 µl destilliertem Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz in eine Plastik-Küvette gegeben und gemischt. Nach Inkubationszeit von 1 min wurde die Probe gegen den Leerwert, 800 µl Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz, im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen. Die gemessene Absorption der Proteinprobe wurde dann mit einer Eichkurve aus BSA (Stammlösung 1 µg/µl) verglichen und so die seinem Extinktionswert entsprechende Konzentration der Proteinprobe ermittelt.

4.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Bei der SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wandert der SDS-Protein-Komplex (Laemmli, 1980) im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach dem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Rehm, 2000). Die Auftrennung erfolgte in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Pharmacia Biotech, Mighty Small) unter Verwendung fertiger 10% Proteingele (Novex Tris-Glycin Gele, Invitrogen). Die aufzutragenden Proteine wurden in 2x

SDS-Probenpuffer bei 95°C 5 min denaturiert und anschließend in die Taschen des Acrylamidgels geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V.

Danach wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, mit der bereits 3-10 ng Protein detektiert werden können. Alle Inkubationsschritte wurden schüttelnd durchgeführt. Zunächst wurde das Gel eine Std. im *Fixierer*, anschließend dreimal je 20 min in 50% EtOH und dann 1 min in der *Thiosulfatlösung* inkubiert. Dann wurde das Gel dreimal je 20 s mit Wasser gewaschen und 20 min in der *Silbernitratlösung* inkubiert. Dann wurde das Gel erneut dreimal je 20 s mit Wasser gewaschen und schließlich mit der *Entwicklerlösung* gebadet, um die Gelbanden hervortreten zu lassen. Mit Wasser wurde diese Reaktion dann gestoppt und das Gel in 50% Methanol 20 min fixiert, dann in Wasser überführt und photographiert.

<i>2x SDS-Probenpuffer:</i>	3,4% SDS; 150 mM Tris/HCl pH 6,8; 50% (v/v) Glycerin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10% (w/v) β -Mercaptoethanol
<i>Fixierer:</i>	50% MeOH; 12% Essigsäure; 0,5 ml 37% Formaldehyd pro Liter
<i>Thiosulfatlösung:</i>	0,2g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ pro Liter
<i>Silbernitratlösung:</i>	2g AgNO_3 ; 750 μl 37% Formaldehyd pro Liter
<i>Entwicklerlösung:</i>	60g Na_2CO_3 ; 4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,5 ml 37% Formaldehyd pro Liter pro Liter

4.2.3 Mikrobiologische Methoden

4.2.3.1 Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika unter Schütteln kultiviert. Plattenkulturen wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die *E. coli*-Stämme wurden als Glycerinkulturen (15% Glycerin) bei -80°C gelagert.

4.2.3.2 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

200 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10-500 ng Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 s auf 42°C hitzegeschockt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und bei 37°C 1 Std. regeneriert (150 rpm). Die Zellen wurden für 5 s pelletiert, resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C. Als Negativ- bzw. Positivkontrollen wurden Transformationsansätze ohne bzw. mit ungeschnittenem Plasmid mitgeführt.

4.2.4 Zellbiologische Methoden

4.2.4.1 Auftauen von Zellen

Die bei -80°C oder flüssigem Stickstoff gelagerte Zellsuspension wurde für 1-2 min in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in C-RPMI-Medium resuspendiert. Durch Zentrifugation (4°C, 1600 rpm; 10 min) und Aufnahme in C-RPMI wurden die Zellen von restlichem DMSO befreit, in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

4.2.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zahl lebender Zellen wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in Zellen mit Membranschäden (v.a. tote Zellen) diffundieren und diese anfärben kann. 30 µl der verdünnten Zellsuspension wurden mit 30 µl Trypanblau (0,5% in PBS) versetzt. Durch Kapillarkräfte wurde die mit Trypanblau versetzte Zellsuspension unter das Deckgläschen der Zählkammer eingesogen. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl lebender, nichtgefärbter Zellen in vier Großquadraten bestimmt. Zellen, die auf den Begrenzungen der Großquadrate lagen, wurden nur bei je zwei Außenkanten pro Quadrat berücksichtigt. Die Zellkonzentration wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^{-4}$$

Die Gesamtzahl der isolierten Zellen ergab sich aus dem Produkt der Zellzahl/ml und dem Volumen der Zellsuspension.

4.2.4.3 Kultivierung von T-Zelllinien

10 Tage nach der Immunisierung wurden den Mäusen die drainierenden Lymphknoten entnommen und mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Cell Strainer von BD Bioscience) in eine Einzelzellsuspension überführt. Diese wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt, in C-RPMI Medium mit 20 µg/ml Antigen ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die T-Zellen wurden für zwei bis drei Tage mit dem Antigen restimuliert, dann mit Hilfe eines Gradienten (NycoPrep™ 1,077A von Axis-Shield) von toten Zellen gereinigt und in Gegenwart von C-RPMI mit *ConA-Überstand* (Endkonz. 6%; Überstand aus ConA-stimulierten Ratten-Milzen) für 7-10 Tage kultiviert. Die im *ConA-Überstand* enthaltenen Wachstumsfaktoren regen die T-Zellen zu Proliferation an.

4.2.4.4 Herstellung von T-Zellklonen

Um T-Zellklone zu erzeugen, wurden die T-Zelllinien nach der Restimulation mit Hilfe des NycoPrep-Gradienten gereinigt und in einer Verdünnung von 0,3 Zellen/Vertiefung in einer 96-U-Boden-Loch-Platte in Gegenwart von C-RPMI mit *ConA-Überstand* (Endkonz. 6%) 4 bis 5 Tage kultiviert. Mikroskopisch wurden die Zellkultur-Platten auf Anwesenheit anwachsender T-Zellen kontrolliert und diese dann mit Antigen (Endkonz. 20 µg/ml) und der entsprechenden Anzahl antigenpräsentierender Zellen, APCs, restimuliert.

Als APCs dienten von Erythrozyten befreite syngene Milzzellen. Um Erythrozyten zu lysieren, wurde die Einzelzellpopulation der Milz mit 1 ml 0,83% NH₄Cl bei RT für 5 min inkubiert. Dann wurden die APCs mit 5000 Rad bestrahlt, um zu verhindern, dass sie sich in der Zellkultur weiter vermehren.

Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendete Kombination von T-Zellen, APC-Anzahl, Zellkulturplatte und Volumen des Mediums, mit der die T-Zellklone aus einer Einzelzellpopulation herangezogen wurden.

T-Zellen	Anzahl der APCs	Zellkultur-Platte / Schale	Volumen
4×10^4	2×10^5	96 U-Boden Loch Platte	200 μ l
1×10^5	5×10^5 bis 1×10^6	96 Flach-Boden Loch Platte	200 μ l
2×10^5	1×10^6	48-Loch Platte	200 μ l
5×10^5	2×10^6 bis 6×10^6	24-Loch Platte	500 μ l
2×10^6	10×10^6	12-Loch Platte	1 ml
3×10^6	$12,5 \times 10^6$	6-Loch Platte	2 ml
5×10^6	25×10^6	6cm Schale	5 ml
10×10^6	50×10^6	10cm Schale	10 ml

4.2.4.5 Proliferationsassays

Milzzellen (2×10^5 /Vertiefung einer 96-U-Platte) oder T-Zellen (4×10^5 mit 2×10^5 APCs/Vertiefung einer 96-U-Platte) wurden unstimuliert oder in Anwesenheit von Antigen in C-RPMI-Medium für 72 Std. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Jeder Ansatz wurde im Triplikat durchgeführt. Während der letzten 16 Std. Inkubation wurde den Kulturen $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin zugegeben und der Einbau des radioaktiv-markierten Nukleotids in die DNA der proliferierenden T-Zellen mit Hilfe eines β -Counters bestimmt. Das Ausmaß der Radioaktivität wurde als cpm (engl.: counts per minute) dargestellt.

4.2.4.6 Einfrieren von T-Zellen

1×10^7 Zellen wurden zentrifugiert (4°C ; 1600 rpm; 10 min) in 0,8 ml *Einfriermedium* resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: C-RPMI-1640; 50% FCS; 10% DMSO

4.2.4.7 Isolierung von Lymphozyten aus dem ZNS

Gehirn und Rückenmark der Maus wurden präpariert, eine Einzelzellsuspension (Gewebehomogenisator) hergestellt, in 5 ml *I-RPMI* aufgenommen und mit 2,16 ml *Isotonic Percoll Stock, SIP* vermischt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 5 ml *Percoll density 1,08 Lsg.* vorgelegt, mit dem Gemisch überschichtet und der Gradient zentrifugiert (20°C ; 2000 rpm, 20 min ohne Bremswirkung!). Lymphozyten, die sich in der Interphase angesammelt hatten, wurden abgenommen, mit C-RPMI gewaschen und gezählt.

I-RPMI: RPMI-1640 mit 200 U/ml Penicillin; 200 μg Streptomycin
Isotonic Percoll Stock, SIP: 9 Teile Percoll und 1 Teil 1,5 M NaCl
Percoll density 1,08 Lsg.: 10 ml SIP und 5,7 ml PBS

4.2.5 Immunologische Methoden

4.2.5.1 FACS (engl.: fluorescence-associated cell sorting)

Zum Nachweis der Expression von Oberflächenmolekülen wurden 1×10^5 bis 1×10^6 der zu testenden Zellen (Einzelzellsuspension von Organen; Zellkultur oder periphere Blutzellen) in die Vertiefung einer 96-V-Boden-Loch-Platte pipettiert. Durch Zentrifugation (4°C ; 1600 rpm; 5 min) wurden die Zellen gesammelt, in der *FACS-Färbelösung* resuspendiert (Endkonz. der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper $10 \mu\text{g/ml}$) und bei 4°C 20 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von $150 \mu\text{l}$ *FACS-Färbelösung* und Zentrifugation (4°C ; 1600 rpm; 5 min) zweimal gewaschen und in PBS oder *FACS-Fixierlösung* aufgenommen. War der erste Antikörper biotinyliert, folgte auf den ersten Waschschrift eine Inkubation mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin (Verdünnung 1/150 bei 4°C für 15 min). Danach wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen.

Für den Nachweis MOG-spezifischer Antikörper im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren wurden EL4- und EL4-MOG-Zellen mit verschiedener Serum-Verdünnung (1/20; 1/50; 1/200) bei 4°C 45 min inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann eine konventionelle FACS-Färbung durchgeführt. Um tote Zellen in der Zellpopulation detektieren und dann von der Analyse ausschließen zu können, wurde Propidiomiodid (Endkonz. $1 \mu\text{g/ml}$) in die PBS-Lösung, in der die gefärbten Zellen am Ende aufgenommen und analysiert wurden, gegeben.

Die Proben wurden in einem FACS-Calibur-Gerät (BD Bioscience) gemessen und anschließend mit Hilfe der Software Cell-Quest oder WinMDI2.9 analysiert. Die logarithmischen Einheiten beider Achsen der FACS-Plots geben die Fluoreszenzintensität wieder. Bei Histogrammen ist auf der X-Achse die Fluoreszenzintensität, auf der Y-Achse die Zellzahl dargestellt.

FACS-Färbelösung: 1xPBS; 1%BSA; 0.1% NaN_3 ;
FACS-Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd in PBS

4.2.5.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen (ICCS)

Um Zytokine im Zellinneren nachweisen zu können, wurden die zu analysierenden Zellen zunächst mit Hilfe der Mitogene PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Ionomycin aktiviert. Dazu wurden die Zellen 4 bis 5 Std. bei 37°C und 5% CO_2 in C-RPMI / 50 ng/ml PMA / 500 ng/ml Ionomycin / $5 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin A inkubiert. PMA aktiviert die zelluläre Proteinkinase C, wohingegen Ionomycin durch eine Zunahme der Membranpermeabilität einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels hervorruft. Diese beiden Mitogene interferieren damit in intrazelluläre Signaltransduktionswege und zielen letztlich auf eine

Genaktivierung hin. Um die Exkretion der produzierten Zytokine zu verhindern, wurde der intrazelluläre Proteintransport mittels Brefeldin A (BFA) blockiert. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen im Zellinneren. Anschließend wurde eine klassische FACS-Oberflächenfärbung (siehe 4.2.5.1) durchgeführt und die Zellen danach gewaschen (4°C; 1600 rpm; 5 min). Dann wurden die Zellen durch Inkubation in PFA-Saponin-Puffer (10 min; RT; im Dunklen wegen der bereits durchgeführten Färbung) fixiert und zugleich permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit Saponin-Puffer gewaschen (4°C; 1600 rpm; 5 min) und eine intrazelluläre Zytokinfärbung (ICCS: engl.: *intracellular cytokine staining*) durchgeführt (30 min, auf Eis, im Dunklen). Anschließend wurden die Zellen erneut mit Saponin-Puffer gewaschen (4°C; 1600 rpm; 5 min) und im FACS-Färbepuffer aufgenommen. Aufgrund der durchgeführten Fixierung bleiben die Zellen bei 4°C bis zu 5 Tagen stabil.

PMA-Stock:	0,1 mg/ml
Ionomycin-Stock:	0,5 m/ml
Brefeldin A-Stock:	10 mg/ml
Saponin-Stock (10%w/v):	1 g Saponin in 10ml HBSS
PFA-Stock (10%w/v):	10 g PFA in 100 ml PBS
FACS-Färbelösung:	1xPBS; 1%BSA; 0.1% NaN ₃ ;
Saponin-Puffer:	99 ml FACS-Färbelösung; 1 ml Saponin-Stock
PFA-Saponin-Puffer:	99 ml HBSS, 40 ml PFA-Stock; 1 ml Saponin-Stock, 1 ml 1 M HEPES; pH 7,5-8

4.2.5.3 Intrazelluläre Färbung zum Nachweis von FoxP3⁺-T-Zellen

Wie für die intrazelluläre Zytokin-Färbung wurde zunächst eine konventionelle FACS-Färbung durchgeführt (siehe 4.2.5.1). Für den Nachweis von FoxP3⁺-Zellen wurde das APC anti-mouse/rat-FoxP3-Färb-Set von eBioscience (#77-5775) verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers verfahren, außer dass der Fixierungs-/Permeabilisierungsschritt nicht länger als 30 min durchgeführt wurde, da sonst die intrazelluläre FoxP3-Färbung nicht mehr gelang.

4.2.5.4 ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Messung von Zytokinen: Milzzellen (2x10⁵/Vertiefung einer 96-U-Boden-Platte) oder T-Zellen (4x10⁵ mit 210⁵ APCs) wurden unstimuliert oder in Anwesenheit von Antigen in C-RPMI-Medium für 72 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, anschließend der Kulturüberstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

Multisorb-ELISA-Platten wurden mit „Capture“-Antikörpern in *Coating-Puffer* (Endkonz. 0,5µg/ml oder entsprechend den Angaben des Herstellers) ü.N. bei 4°C beschichtet und

anschließend 4x mit je 200 µl *Wasch-Puffer* gewaschen. Es wurde mit *Assay Diluent* bei RT für 1 Std. geblockt, 6x mit je 200 µl *Wasch-Puffer* gewaschen und dann 100 µl des Kulturüberstands bzw. des Zytokinstandards (beginnend mit 2000 pg/ml bis 11-fach verdünnt) bei RT für 2 Std. appliziert. Dann wurde 8x mit je 200 µl *Wasch-Puffer* gewaschen und 100 µl des biotinylierten Antikörpers (Endkonz. 0,5 µg/ml) bei RT für 1 Std. zugegeben. Erneut wurde 10x mit je 200 µl *Wasch-Puffer* gewaschen, bevor mit HRP gekoppeltem Straptavidin (1/2000 verdünnt) bei RT für 30 min inkubiert wurde. Abschließend wurde 12x mit je 200 µl *Wasch-Puffer* gewaschen und 200 µl H₂O₂-aktivierte *Substratlösung* zugegeben und die Absorption in einem ELISA-Messgerät (Victor2TM 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer life sciences) gemessen.

Messung von Antikörpern: Zum Nachweis von MOG-spezifischen Antikörpern oder zur Bestimmung des Isotyptiters im Serum wurde anstelle des Kulturüberstands das verdünnte Serum auf die beschichteten Platten appliziert und die Messung der Standardkurve mit entsprechenden Isotyp-Kontrollen durchgeführt.

<i>Coating-Puffer</i> :	01 M Carbonate-Puffer, pH 9,5
<i>Wasch-Puffer</i> :	1xPBS; 0,05% Tween-20
<i>Assay-Diluent</i> :	1xPBS; 10% FCS
<i>Substratlösung</i> :	Für 500 ml: 150 mg ABTS in 500 ml 0,1 M Zitronensäure

4.2.6 Arbeiten mit (transgenen) Mäusen

4.2.6.1 Tierhaltung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Mäuse hatten den genetischen Hintergrund von SJL/J- oder B10.S-Tieren und wurden unter konventionellen Bedingungen in den Tierställen des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie gehalten. SJL/J-Wt-Tiere wurden von Charles-River, B10.S-Wt-Tiere vom McLaughlin-Research-Institute, USA, bezogen. Materialteil 4.1 gibt einen Überblick über die transgenen Tiere, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

4.2.6.2 Genotypisierung

Ab einem Alter von drei bis vier Wochen wurden die Tiere mit einer Ohrmarke (Hauptner & Herberholz) markiert und eine Schwanzbiopsie für die Genotypisierung genommen. Die Präparation der genomischen DNA aus der Biopsie erfolgte wie unter 4.2.1.1.4, die PCR-Analyse der gewonnenen DNA aus TZR-C3-Tieren wie unter 4.2.1.8 beschrieben. Für die Genotypisierung von Rag2- und MOG-Knock-Out-Tieren wurde eine PCR-Analyse mit den unter 4.1.3 beschriebenen Oligonukleotid-Primern durchgeführt. Für die Genotypisierung von IgH^{MOG}-Tieren wurde eine Real-time-PCR-Analyse mit den unter 4.1.3 beschriebenen Oligonukleotid-Primern und Proben durchgeführt.

4.2.6.3 Gewinnung von Serum

Die Mäuse wurden mit Diethyläther betäubt und das Blut durch retro-orbitale Punktion entnommen. Die Blutproben wurden zur Gerinnung ü.N. bei 4°C inkubiert, anschließend bei 4°C und 400 g für 10 min zentrifugiert und das Serum abgenommen.

4.2.6.4 Immunisierung von Mäusen

Für die Emulsion wurde zunächst CFA (engl.: complete Freund's adjuvant) hergestellt, indem IFA (engl.: incomplete Freund'adjuvant, Difco) mit 6 mg/ml Mykobakterium tuberculosis (Stamm H37RA, Difco; Endkonzentration 3 mg/ml) durch Vortexen vermengt wurde. Das CFA wurde anschließend über zwei miteinander verbundene Spritzen mit der Antigenlösung (2 mg/ml in PBS) zu einer Emulsion vermengt. Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und mit 200 µl der Emulsion subkutan am Rücken immunisiert. Pertussistoxin (200 ng in 200 µl, LISI) wurde intraperitoneal am 1. und 3. Tag der Immunisierung appliziert.

4.2.6.5 Adoptiver Transfer

Beim adoptiven Transfer wurden T-Zellen mit Antigen (Endkonz. 20 µg/ml) in C-RPMI bei 37°C und 5% CO₂ 48 Std. stimuliert und anschließend mit Hilfe eines Nycoprep-Gradienten von toten Zellen gereinigt. Dann wurden die Zellen gezählt, in PBS aufgenommen und intraperitoneal (5x10⁵ bis 20x10⁶ Zellen je Maus) in weibliche SJL/J-Wt-Tiere injiziert.

4.2.6.6 Bestimmung des EAE-Krankheitsgrades

Der klassische EAE-Krankheitsgrad mit Paralyse wurde von John Wiley&Sons Current Protocols in Immunology übernommen und um die 0,5-Werte ergänzt.

Grad	Klinische Anzeichen
0	Normal, keine offensichtlichen Krankheitsanzeichen
0,5	Tonusverlust im Schwanz, aber noch nicht gelähmt
1	Gelähmter Schwanz – Maus kann nicht auf den Rücken gedreht werden
1,5	Gelähmter Schwanz – Maus kann auf den Rücken gedreht werden und kommt mit Verzögerung in Ausgangslage zurück
2	Gelähmter Schwanz und Hinterbeinschwäche
2,5	Paralyse eines Hinterbeins
3	Hinterbeinparalyse, aber – mit eingeschränkten Bewegungen – Fortbewegung möglich
3,5	Vollständige Hinterbeinparalyse
4	Vollständige Hinterbeinparalyse bis zur Hüfte – beginnende Vorderbeinparalyse
5	Moribund durch EAE

Die Tabelle für die Bewertung des EAE-Krankheitsgrades mit Ataxie wurde anhand der in dieser Arbeit beschriebenen *RR-Maus* erstellt.

Grad	Klinische Anzeichen
0	Normal, keine offensichtlichen Krankheitsanzeichen
1	Maus stolpert mit Hinterbeinen durch Käfigdeckelgitterstäbe
2	Maus kippt beim Sitzen – fällt nach Aufrichten an Käfigwand um
3	Maus stolpert beim Laufen über Käfigstreu – kann sich nicht mehr an Käfigwand aufrichten
4	Kontinuierliche Rotationsbewegung – keine geraden Bewegungen mehr möglich

4.2.7 Immunhistologie

Für die histologische Analyse, die von Prof. H. Lassmann am Institut für Hirnforschung in Wien durchgeführt wurde, wurden die Tiere zuvor mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert und anschließend für mind. 24 Std. in 4% Paraformaldehyd in PBS postfixiert. Gehirn und Rückenmark sowie optischer Nerv wurden entweder in Paraffin eingebettet oder es wurden Gefrierschnitte davon angefertigt. Serielle Schnitte der Organe wurden mit Luxol Fast Blue oder der Bielschowsky Silber Imprägnierlösung sowie mit Antikörpern gegen CD3, Mac-3 und Ig (anti-IgM, IgG und IgA) angefärbt.

Für die eigene Immunhistologie wurden Gehirn und Rückenmark in TissueTek OCT eingebettet und auf Trockeneis rasch eingefroren. Anschließend wurden serielle Gefrierschnitte mit 8-14 µm Dicke angefertigt. Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst in -20°C kalten 95% EtOH bei 4°C für 10 min fixiert, bei RT getrocknet, mit einem Fettstift die zu färbenden Bereiche eingegrenzt und mit *Blockier- und Waschlösung* bei RT für 20 min geblockt. Unspezifische Bindungsstellen, die die anschließende Färbung inhibieren könnten, wurden mit dem Avidin-Biotin-Blocking-Kit (Vector Laboratories) abgesättigt, bevor der primäre Antikörper (Endkonz. 5 µg/ml) in der *Blockier- und Waschlösung* bei RT 1 Std. auf dem Gefrierschnitt inkubiert wurde. Das Präparat wurde zweimal mit der *Blockier- und Waschlösung* gewaschen, mit dem sekundären Antikörper (biotinylierter αRat IgG 1/200 verdünnt (Vector Laboratories)) inkubiert und die gefärbten Zellen wurden anschließend mit dem Vectastain-ABC- und dem DAB-Substrat-Kit den Angaben der Hersteller gemäß detektiert. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Mayer's Hämatoxilin (3 bis 5 min), das alle kernhaltigen Zellen anfärbt. Abschließend wurden die Präparate mit zwei bis drei Tropfen Aquamount versehen, eingedeckelt und getrocknet.

Blockier- und Waschlösung: 1xPBS; 2% FCS

5. Ergebnisse

5.1 Herstellung MOG-spezifischer TZR-C3-transgener Mäuse

5.1.1 Charakterisierung des MOG-spezifischen T-Zellklons C3

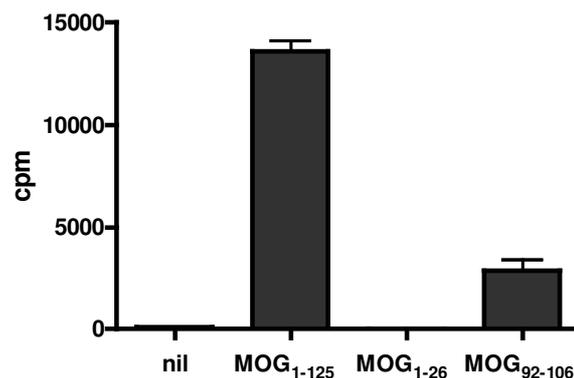
Da jeder T-Zell-Rezeptor, TZR, spezifisch für einen bestimmten Peptid-MHC-Komplex ist, unterscheidet sich die Herstellung einer T-Zell-Rezeptor-transgenen Maus grundlegend von jener für andere transgene Modelle. Als Matrize für ein TZR-transgenes System dient immer ein antigenspezifischer T-Zellklon, dessen TZR möglichst gut charakterisiert und kloniert werden kann.

Für die Erzeugung von MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor-transgenen SJL/J-Mäusen wurden zunächst MOG-spezifische, I-A^S-restringierte T-Zellklone generiert und analysiert. Dazu wurden von vier verschiedenen MOG-spezifischen T-Zelllinien (L1, L21, L25 und L48), die durch Immunisierung von SJL/J-Mäusen mit MOG₁₋₁₂₅ erzeugt worden waren, MOG-spezifische T-Zellklone gewonnen. Die Tabelle unter 4.1.2 gibt einen Überblick über alle charakterisierten MOG-spezifischen T-Zellklone. Es stellte sich heraus, dass der C3-T-Zellklon, der von der T-Zelllinie L48 abstammte, für die Herstellung einer TZR-transgenen Maus sehr gut geeignet war, da er folgende Eigenschaften besaß:

- 1.) Der T-Zell-Rezeptor des C3-Klons war spezifisch für MOG₁₋₁₂₅ sowie für das in SJL/J-Mäusen immundominante Peptid MOG₉₂₋₁₀₆ im MHC-Klasse-II-Kontext von I-A^S (Amor et al., 1994) (siehe Abb. 5.1).

Abbildung 5.1:
Der C3-T-Zellklon war spezifisch für MOG₁₋₁₂₅ und MOG₉₂₋₁₀₆.

4x10⁴ Zellen des C3-T-Zellklons wurden mit 2x10⁵ APCs (I-A^S) in Gegenwart von 20µg/ml MOG₁₋₁₂₅, MOG₁₋₂₆ und MOG₉₂₋₁₀₆ inkubiert und ein Proliferationsassay durchgeführt. Abgebildet ist das Resultat aus zwei unabhängigen Experimenten, die je im Triplikat durchgeführt wurden. Fehlerindikator=SEM (engl.: standard error of the mean); cpm= engl.: counts per minute

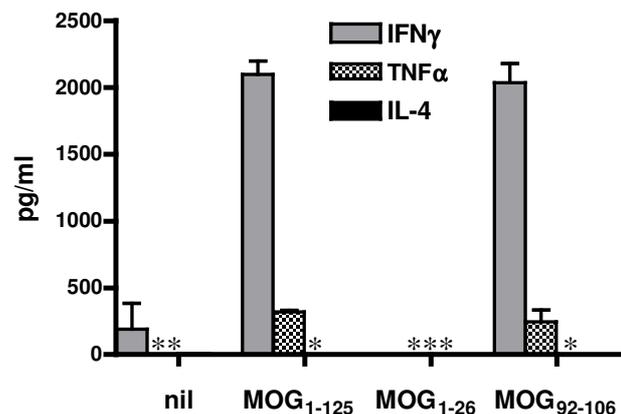


Wie das Resultat des Proliferationsassays zeigt, war der C3-T-Zellklon spezifisch für MOG₁₋₁₂₅ und MOG₉₂₋₁₀₆, aber nicht für MOG₁₋₂₆, wobei die Reaktivität gegenüber dem MOG₁₋₁₂₅-Protein wesentlich höher war als gegenüber dem MOG₉₂₋₁₀₆-Peptid. Letzteres war insofern erstaunlich, als das MOG₉₂₋₁₀₆-Peptid bei gleicher Konzentration in höherer Molarität vorlag als das MOG₁₋₁₂₅-Protein. Es wäre möglich, dass das MOG₉₂₋₁₀₆-Peptid, unter anderem

weil es einen Cystein-Rest enthält, der wiederum zur Ausbildung von Disulfidbrücken neigt, sehr instabil ist und deshalb bei gleicher Konzentration eine geringere Proliferation des T-Zellklons induziert. Für weitere Experimente wurde die Peptid-Konzentration auf 100 µg/ml angehoben und anstelle des MOG₉₂₋₁₀₆-Peptids das MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid verwendet, da es eine stärkere Proliferation induzieren konnte.

Um das Zytokin-Profil des C3-T-Zellklons nach antigenspezifischer Stimulation mit MOG zu bestimmen, wurde der Kulturüberstand aus den in Abb. 5.1 dargestellten Proliferationsassays mittels Sandwich-ELISA auf Anwesenheit der Zytokine IFN γ , TNF α und IL-4 untersucht (siehe Abb. 5.2). Es stellte sich heraus, dass der C3-T-Zellklon die T_H1-spezifischen Zytokine IFN γ und TNF α sezernierte, nicht jedoch das T_H2-spezifische Zytokin IL-4, insofern handelte es sich bei C3 um einen T_H1-spezifischen T-Zellklon.

Abbildung 5.2:
Der C3-T-Zellklon sezernierte antigen-spezifisch die Zytokine IFN γ und TNF α , aber nicht IL-4.
 Die in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine aus den in Abb. 5.1 dargestellten Proliferationsassays wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die absoluten Mengen an IFN γ , TNF α und IL-4 wurden anhand einer Standardkurve berechnet, in welcher das jeweilige rekombinant hergestellte Zytokin als Standard verwendet wurde. Dargestellt ist das Resultat aus zwei unabhängigen Experimenten. Fehlerindikator= SEM; *=nicht detektierbar



2.) In Autoimmunreaktionen kommt neben IFN γ dem T_H17-spezifischen Zytokin IL-17 eine wachsende Bedeutung zu (Komiyama et al., 2006). Deshalb wurde der C3-T-Zellklon in einer intrazellulären Zytokin-Färbung untersucht, ob es außer IFN γ -produzierenden Zellen auch IL-17-produzierende Zellen gab (siehe Abb. 5.3 B).

Darüber hinaus sollte festgestellt werden, welchen Corezeptor der C3-T-Zellklon trug (siehe Abb. 5.3 A) und wie die variablen Domänen des T-Zell-Rezeptors zusammengesetzt waren. Die Zellen des C3-T-Zellklons wurden dazu mit Hilfe des FACS-TZR-Panels, das alle kommerziell verfügbaren Antikörper gegen verschiedene V α - und V β -Domänen des TZR der Maus enthält, analysiert (siehe Abb. 5.4). Wenn es gelingt, die Identität der V α - und V β -Kette eines T-Zell-Rezeptors zu bestimmen, ist die Charakterisierung von zukünftigen transgenen Tieren wesentlich erleichtert, da die TZR-transgenen Zellen mit den spezifischen Antikörpern leicht detektiert werden können.

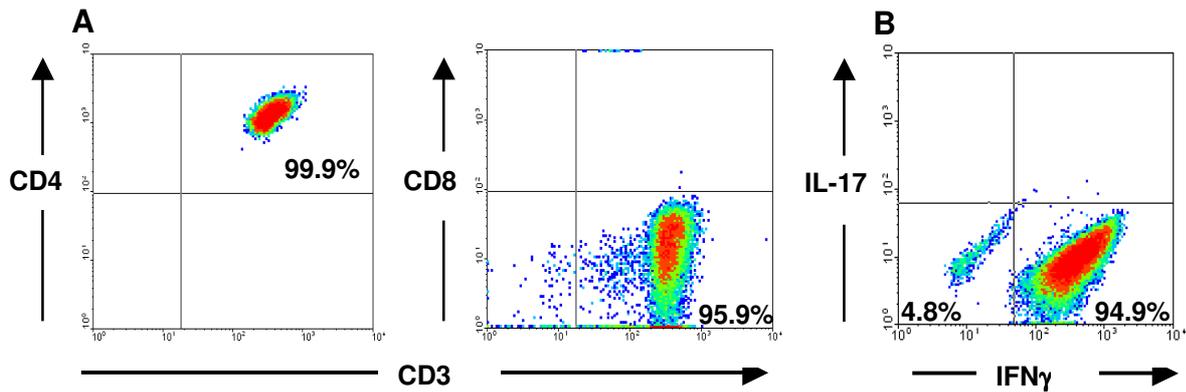


Abbildung 5.3:
Der C3-T-Zellklon ist CD3⁺CD4⁺ und CD8⁻ und produziert das Zytokin IFN γ , aber nicht IL-17.
(A) In einer FACS-Färbung (α -CD3, α -CD4 und α -CD8) wurden Zellen des C3-T-Zellklons analysiert. Die Zahlen in den Quadranten beziehen sich auf den Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. **(B)** Intrazelluläre Zytokin-Färbung (α -IFN γ und α -IL-17) nach Permeabilisierung und Fixierung der C3-Klonzellen.

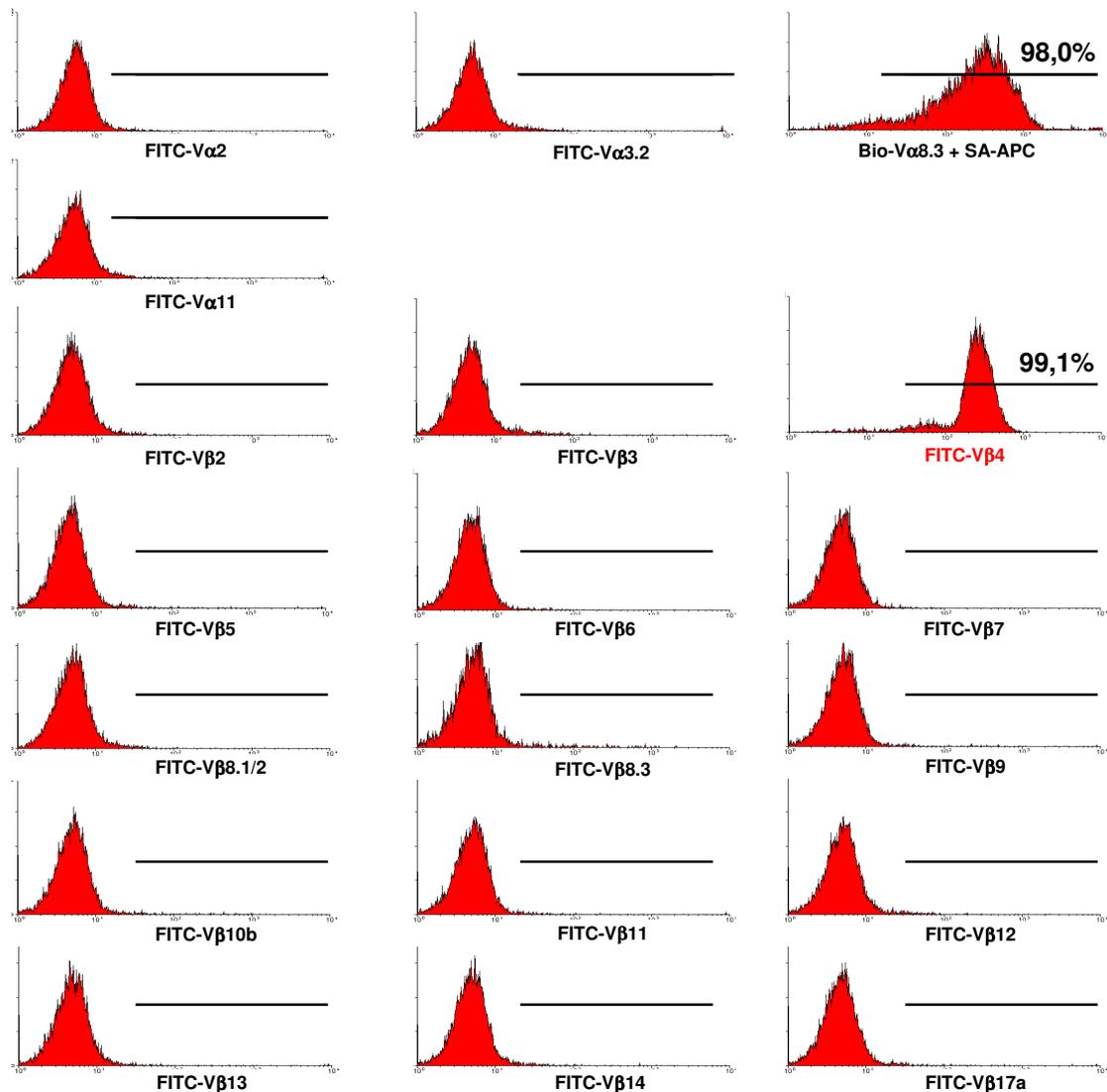


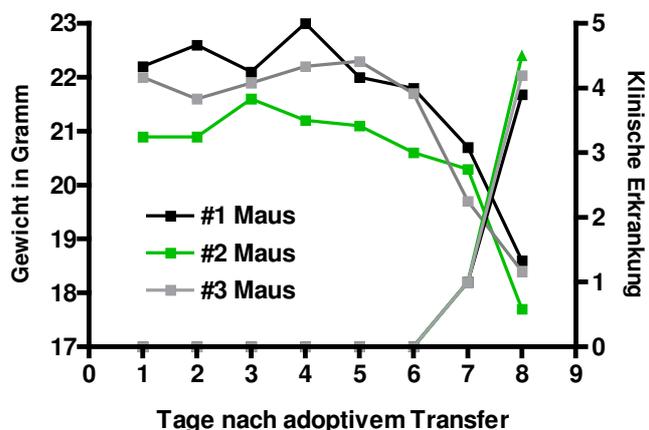
Abbildung 5.4:
Der C3-T-Zellklon exprimiert einen T-Zell-Rezeptor mit den variablen Domänen Vα8.3 und Vβ4.
 In einer FACS-Färbung mit Antikörpern gegen verschiedene Vα- und Vβ- (variable) Domänen des T-Zell-Rezeptors, TZR-Panel, wurden Zellen des C3-T-Zellklons analysiert. Der Balken in jedem Histogramm umfasst die Region, in der gefärbte Zellen zu finden sind. Zahlen entsprechen dem Prozentsatz gefärbter Zellen in der markierten Region.

Wie die Abbildung 5.3 zeigt, handelte es sich bei C3 um einen CD4⁺-T_H1-spezifischen T-Zellklon, der IFN γ , aber kein IL-17 produzierte. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass der C3-T-Zellklon einen T-Zell-Rezeptor exprimierte, dessen variable Domäne aus V α 8.3 und V β 4 zusammengesetzt war. Bei der Analyse der verschiedenen MOG-spezifischen T-Zellklone (siehe Tab. unter 4.1.2) konnte in 6 der 21 analysierten Klone die V α 8.3- bzw. sogar in 11 Klonen die V β 4-Kette als Bestandteile des T-Zell-Rezeptors identifiziert werden.

3.) Wie der Proliferationsassay in Abb. 5.1 zeigt, war der TZR des C3-T-Zellklons, spezifisch für das in SJL/J-Mäusen enzephalitogene Peptid, MOG₉₂₋₁₀₆. Wenn T-Zellen autoaggressives, enzephalitogenes Potential haben, können sie bei adoptivem Transfer in syngenen Tieren EAE induzieren. Um das enzephalitogene Potential des C3-T-Zellklons zu bestimmen, wurden die Zellen mit MOG₁₋₁₂₅ stimuliert und anschließend in weibliche SJL/J-Wt-Tiere adoptiv transferiert. Die Tiere wurden täglich gewogen und der Grad der EAE-Erkrankung bestimmt (siehe Abb. 5.5).

Abbildung 5.5:
Der C3-T-Zellklon war bei adoptivem Transfer in SJL/J-Wt-Tiere enzephalitogen.

Je 20x10⁶ MOG₁₋₁₂₅ aktivierte C3-Zellen wurden i. p. in drei weibliche SJL/J-Wt-Tiere (Alter drei Monate) injiziert. Dargestellt sind der Verlauf der klinischen Erkrankung (rechte Y-Achse mit EAE-Grad) und der Gewichtsverlauf (linke Y-Achse mit Gewicht in Gramm) über die Zeit (X-Achse mit Tagen nach Injektion der Zellen). Zusammengehörende Werte (Gewicht und EAE-Grad) einer Maus sind in je einer der Farben Schwarz, Grün und Grau abgebildet. Dargestellt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten.



Wie Abb. 5.5 zeigt, war der C3-T-Zellklon bei adoptivem Transfer stark enzephalitogen, da alle drei Mäuse innerhalb einer Woche EAE entwickelten, begleitet von starkem Gewichtsverlust.

Die histologische Analyse dieser Tiere zeigte eine massive Infiltration von CD3⁺- und CD11b⁺-Zellen ins Cerebellum und in Bereiche um den IV.-Ventrikel des Gehirns (siehe Abb. 5.6) sowie in die Medulla oblongata und entlang des Rückenmarks (Daten nicht gezeigt). Das bedeutete, dass der *in vitro* erzeugte T_H1-spezifische Zellklon C3 in der Lage war, *in vivo* in SJL/J-Wt-Tieren EAE zu induzieren.

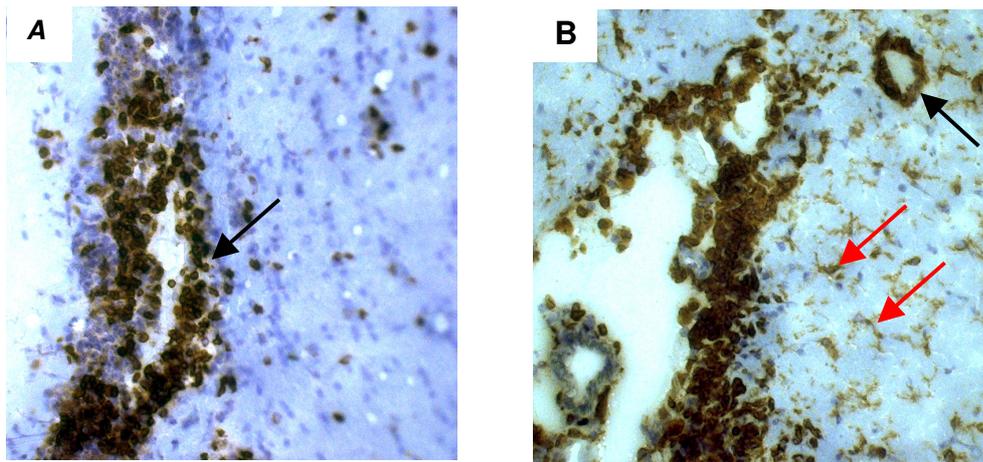


Abbildung 5.6:

Histologische Analyse des Gehirns einer SJL/J-Wt-Maus nach adoptivem Transfer von MOG₁₋₁₂₅-aktivierten C3-T-Zellen

(A) und (B) zeigen Areale des Gehirns im Bereich des IV-Ventrikels am Übergang des Stammhirns zu Cerebellum. **(A)** Infiltration **CD3⁺**-Zellen (schwarzer Pfeil), **(B)** Einwanderung **CD11b⁺**-Zellen unter Ausbildung eines perivaskulären „Cuffs“ (schwarzer Pfeil) und eine mögliche Aktivierung CD11b⁺-Mikroglia (rote Pfeile). 20xVergrößerung; Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin

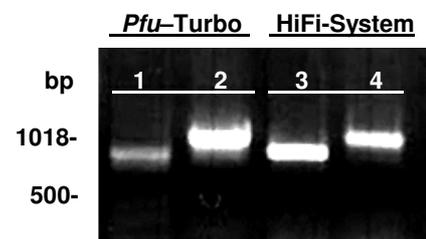
5.1.2 Klonierung der V α 8.3- und V β 4-Kette des T-Zell-Rezeptors und Herstellung TZR-C3-transgener Mäuse

Die bisher beschriebene Charakterisierung des C3-T-Zellklons zeigte, dass sich dieser für die Herstellung einer TZR-transgenen Maus eignete, da sein TZR spezifisch für MOG₁₋₁₂₅ und MOG₉₂₋₁₀₆ war und zudem die variablen Domänen des TZRs, V α 8.3 und V β 4, identifiziert werden konnten. Darüber hinaus war der C3-T-Zellklon bei adoptivem Transfer in SJL/J-Wt-Tiere enzephalitogen.

Mit Hilfe der in der IMGT-Datenbank (<http://imgt.fr>) vorhandenen Sequenzen für T-Zell-Rezeptoren von *Mus musculus* konnten Oligonukleotid-Primer entworfen werden, die es ermöglichten, die vollständigen Sequenzen der V α 8.3- und V β 4-Kette des T-Zell-Rezeptors von C3 zu klonieren. Dazu wurde zunächst die RNA des T-Zellklons gewonnen, die cDNA davon synthetisiert und diese dann als PCR-Matrize für die Amplifikation der vollständigen α - und β -Kette des TZRs eingesetzt. Um eine möglichst hohe Amplifikations-Treue zu gewährleisten, wurde für die PCR zum einen die *Pfu*-Turbo-Polymerase und zum anderen das High-Fidelity-Kit-System (HiFi-System, Stratagene) verwendet (siehe Abb. 5.7).

Abbildung 5.7:
Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der amplifizierten cDNA der V α 8.3- und V β 4-Kette des C3-T-Zell-Rezeptors

Die PCR für die V α 8.3-Kette (Spur 1 und 3; Primer mTCRV α 8.3sense und mTCR-C α as) und für die V β 4-Kette (Spur 2 und 4; Primer mTCRV β 4sense und mTCR-C2 β as) wurden mit der *Pfu*-Turbo-Polymerase (Spur 1 und 2) bzw. dem High-Fidelity-Kit-System (Spur 3 und 4) durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel analysiert. Die Größen des DNA-Längenstandards sind am linken Bildrand angegeben.



Die gewonnenen PCR-Produkte von der V α 8.3- und V β 4-Kette wurden in den pBluescript-Vektor kloniert, in DH5 α transformiert und sequenziert. Um die exakten Sequenzen der V α 8.3- und V β 4-Kette des TZRs zu bestimmen, wurden für jede Kette mehrere unabhängige *E. coli*-Klone aus beiden Amplifikationen sequenziert und miteinander verglichen (siehe Anhang Abb. 8.1).

Zunächst wurden die erhaltenen Sequenzen für die V α 8.3-Kette und V β 4-Kette bzgl. ihrer Homologie zu bereits bekannten T-Zell-Rezeptoren der gleichen Spezifität untersucht (siehe Anhang Tab. 8.2). Anschließend wurden die CDR3-Regionen der V α 8.3- und V β 4-Ketten bestimmt. Die CDR3-Region (engl.: complementarity determining region) ist jener Teil der hypervariablen Region des T-Zell-Rezeptors mit der größten Variabilität und demzufolge mit

der höchsten Spezifität für einen Peptid-MHC-Komplex. Jeder TZR verfügt über eine einzigartige CDR3-Region (siehe Abb. 5.8).

CDR3-V α 8.3



CDR3-V β 4



Abbildung 5.8:

Anhand ihrer Nukleotidsequenzen konnten mit Hilfe des Programms IMGT/V-Quest die CDR3-Regionen der V α 8.3 -und V β 4-Kette des TZRs bestimmt werden.

Die **CDR3-Region von V α 8.3** hat eine Länge von 10As und bestand aus der V α 8.3- (blau), der J α 4- (orange) und der C α -Sequenz (schwarz). Die **CDR3-Region der β 4-Kette** hat eine Länge von 14As und setzte sich aus der V β 4- (blau), der D β 1- (grau), der J β 2- (orange) und der C β 2-Sequenz (schwarz) zusammen. Angegeben ist jeweils die Nukleotidsequenz der CDR3-Region von 5' nach 3' bzw. die entsprechende Peptid-Sequenz vom N- zum C-Terminus in der darunter liegenden Zeile.

Die α -Kette bestand aus den V α 8.3–J α 4–C α -Gensegmenten, die β -Kette aus den V β 4–D β 1–J β 2–C β 2-Gensegmenten. Wie bereits erwähnt, konnte die V β 4-Kette in mehreren Klonen als Bestandteil des TZRs identifiziert werden, die CDR3-Regionen waren jedoch in den analysierten Klonen (n=3) von verschiedener Sequenz und Länge (Daten nicht gezeigt).

Für die transgene Expression in der Maus wurden die TZR-Ketten in den pHSE3'-Vektor kloniert (die Klonierungsstrategie ist unter Mat. & Met 4.2.1.14 beschrieben). Die Wahl des pHSE3'-Vektors für die Expression der transgenen Konstrukte mag zunächst verwundern, gibt es doch viele TZR-transgene Mäuse, in denen endogene, genomische TZR α - und β -Ketten-Promotoren verwendet werden, wie auch die in dieser Arbeit mehrfach zitierten 2D2-TZR-transgenen Mäuse von Bettelli et al. 2003. Die Expression der transgenen TZR-Konstrukte im pHSE3'-Vektor wurde von einem mausspezifischen MHC-Klasse-I-Promotor (H-2K^b) kontrolliert, der theoretisch in allen Körperzellen funktionell ist. Da ein TZR aber nur gemeinsam mit dem CD3-Komplex an die Oberfläche einer T-Zelle gelangen kann (Samelson et al., 1985; Wegener et al., 1995), konnten Pircher et al. (1989) zeigen, dass sich dieser Vektor gut für die Expression eines transgenen T-Zell-Rezeptors eignet. Außerdem hatte der pHSE3'-Vektor eine geringere Größe als vergleichbare Expressionsvektoren mit genomischen

TZR-Promotoren, was die Klonierungsstrategien vereinfachte und die Mutationshäufigkeit reduzierte. Der schematische Aufbau des pHSE3'-Vektors ist nachfolgend dargestellt.

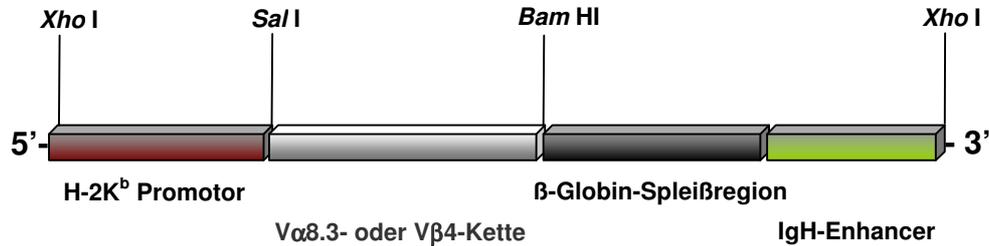


Abbildung 5.9:

Aufbau des pHSE3'-Vektors mit der Vα8.3- oder Vβ4-Kette des C3-T-Zellklons

Die vollständige Vα8.3- und Vβ4-cDNA des T-Zell-Rezeptors von C3 wurde in die *Sal*I- und *Bam*HI-Schnittstelle des Expressions-Vektors pHSE3' kloniert. Die transgene Expression der TZR-Konstrukte wurde vom 5'-gelegenen murinen MHC-Klasse-I-Promotor H-2K^b (rot, 2kb) und vom 3'-lokalisiertem Enhancer der schweren Kette der Immunglobuline (grün, 1.5kb) gesteuert. Das unmittelbar 3' an die subklonierten TZR-Ketten angegliederte poly-(A)-Signal des humanen β-Globin-Gens (schwarz, 1.7kb) gewährleistete eine optimale posttranskriptionelle Modifikation der Konstrukte (Pircher et al., 1989). Über die *Xho*I-Restriktionsenzym-Schnittstelle wurden die Konstrukte von den bakteriellen Komponenten, ori und Amp^R-Gen (nicht dargestellt, siehe Anhang 8.3), des pHSE3'-Vektors getrennt und das Plasmid zugleich linearisiert.

Die pHSE3'-Vα8.3- und pHSE3'-Vβ4-Konstrukte wurden gleichzeitig in drei verschiedenen DNA-Mengen (je 1 ng, 1.5 ng oder 2 ng) in befruchtete Eizellen von FVB-Mäusen (I-A^q) mikroinjiziert und in scheinchwangere Ammen-Mäuse transferiert. Insgesamt wurden 82 Tiere geboren, die mittels PCR auf einer Schwanzbiopsie getestet wurden, ob sie positiv für die transgenen TZR-C3-Konstrukte waren. Um positive Mäuse identifizieren zu können, wurde zunächst eine PCR-„Screening-Methode“ entwickelt. Diese und exemplarische Resultate aus der Identifizierung TZR-C3-transgener Tiere sind in Abbildung 4.3 (unter Mat. & Meth.) dargestellt. Alle positiv getesteten Tiere (13 doppelt-positive Vα⁺/Vβ⁺ und 2 nur Vβ⁺), die sogenannten Founderlinien, wurden mit SJL/J-Wt-Tieren zur Verpaarung angesetzt und die F1-Generation daraus analysiert, um festzustellen, wie viele Tiere die transgenen TZR-C3-Konstrukte in der Keimbahn trugen. Die Tabelle 4.2 (in Mat. & Meth.) gibt einen Überblick über alle erhaltenen (Keimbahn-positiven) FVB-Founder-Tiere und zeigt auf, dass die 2 ng-Mikroinjektion am effizientesten war, um transgene Tiere zu erzeugen. Um den für den C3-T-Zell-Rezeptor passenden MHC-Haplotyp (I-A^s) in den Hintergrund der transgenen Tiere einzuführen, wurden die sieben erhaltenen Keimbahn-positiven Founderlinien wiederholt gegen SJL/J-Wt zurückgekreuzt. Alle im Folgenden dargestellten Ergebnisse stammen aus Experimenten, in denen ausschließlich Tiere verwendet wurden, die mindestens fünf Generationen auf den SJL/J-Stamm zurückgekreuzt worden waren.

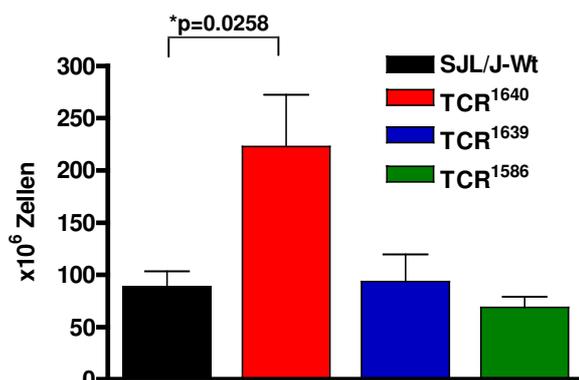
5.2 Charakterisierung MOG-spezifischer TZR-C3-transgener SJL-Mäuse

Bei der Analyse der TZR-C3-transgenen Mäuse stellten sich die drei Founderlinien TCR¹⁶⁴⁰, TCR¹⁶³⁹ und TCR¹⁵⁸⁶ als besonders interessant heraus, da sie eine unterschiedliche Penetranz des transgenen T-Zell-Rezeptors zeigten. Die Founderlinie TCR¹⁶⁴⁰ wurde als „High frequency-Linie“ bezeichnet, da die meisten ihrer CD4⁺-T-Zellen den transgenen TZR exprimierten. Die Linie TCR¹⁶³⁹, in der ca. 30% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den transgenen TZR exprimierten, wurde „Medium frequency-Linie“ genannt. Entsprechend wurde die TCR¹⁵⁸⁶-Founderlinie, in welcher nur etwa 5% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den transgenen TZR exprimierten, als „Low frequency-Linie“ bezeichnet. Die übrigen vier Keimbahn-positiven Founderlinien zeigten entweder nahezu keine Expression des transgenen TZR (1-2% der CD4⁺-T-Zellen; Linie TCR¹⁶¹³ und TCR¹⁶²¹) oder eine diffuse und ungleichmäßige Expression mit einer Dominanz der α -Kette (Linie TCR¹⁶¹⁸ und TCR¹⁶³⁵) (Daten nicht gezeigt).

5.2.1 Oberflächen-Expression des T-Zell-Rezeptors im Thymus von TZR-C3-transgenen Mäusen

Der Thymus ist der Ort, an dem lymphatische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu T-Zellen heranreifen und damit beginnen, ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor und Corezeptor zu exprimieren. Außerdem findet hier die sogenannte positive und negative Selektion statt, d.h. es können nur solche T-Zellen den Thymus verlassen, die zum einen spezifisch für den eigenen MHC sind und zum anderen keine Autoreaktivität aufweisen bzw. deren autoaggressives Potential unentdeckt bleibt. Nachfolgende Abbildung zeigt, dass die Anzahl der Thymozyten in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren gegenüber SJL/J-Wt signifikant erhöht war, nicht aber in TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Mäusen.

Abbildung 5.10:
Anzahl der Thymozyten von TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Mäusen im Vergleich zu SJL/J-Wt
Der Thymus aus SJL/J-Wt- (n=5), TCR¹⁶⁴⁰- (n=7), TCR¹⁶³⁹- (n=3) und TCR¹⁵⁸⁶-Mäusen (n=4) wurde präpariert (Alter 8-10 Wochen) und die Lebendzellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer und Trypanblau bestimmt. Der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenz in der Thymuszellzahl signifikant war. Fehlerindikator=SEM



Um die genaue Zusammensetzung des Thymus zu bestimmen, wurden die Thymozyten der verschiedenen Linien im FACS mit Hilfe von Antikörpern gegen CD4 und CD8 sowie gegen die V α 8.3- und V β 4-Kette des transgenen TZR analysiert (siehe Abb. 5.11).

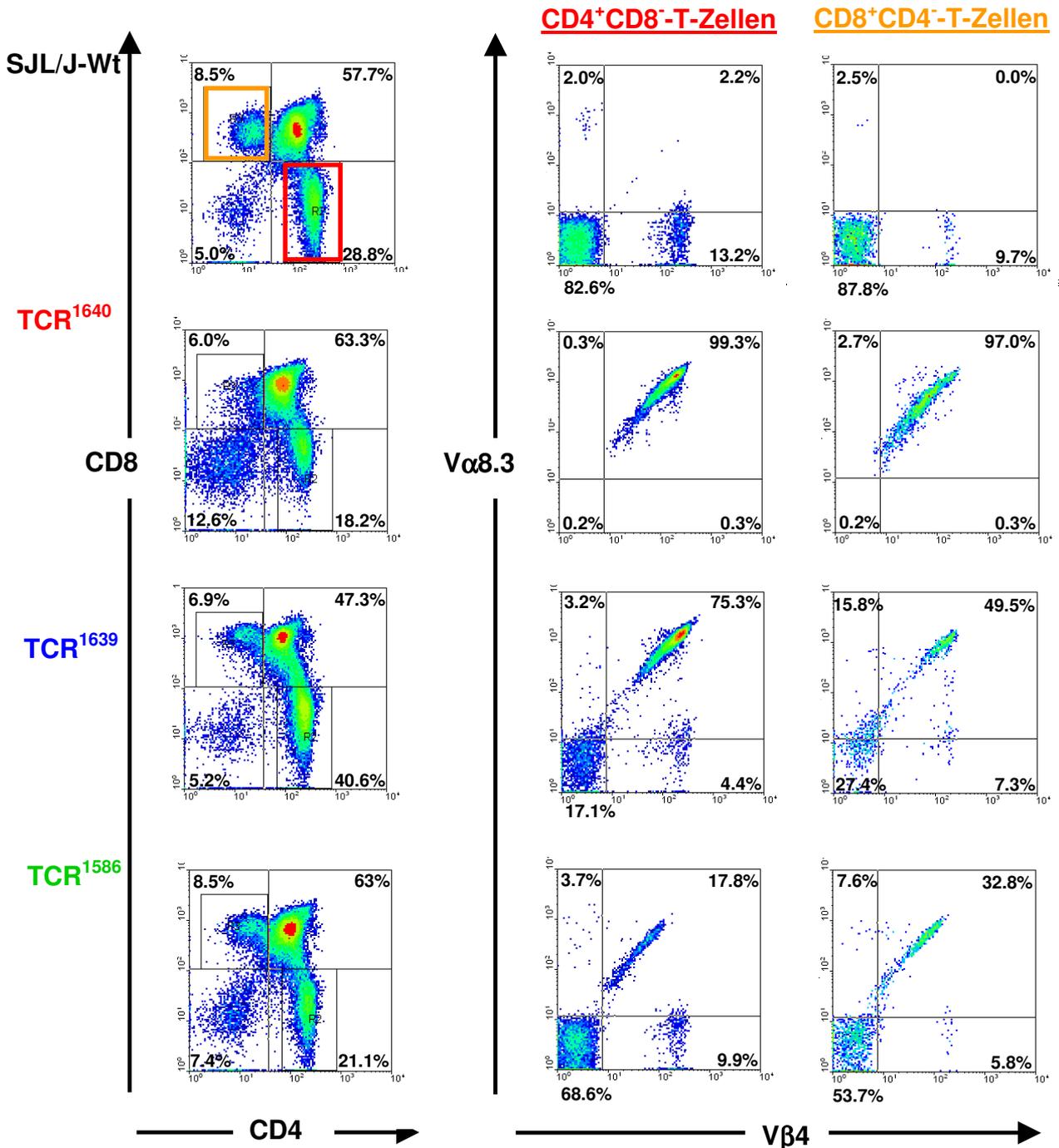


Abbildung 5.11:
FACS-Analyse von Thymozyten der TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Linie im Vergleich zu SJL/J-Wt
 Thymozyten der verschiedenen Mauslinien (Alter 8-10 Wochen) wurden in einer Vierfärbung (α -CD4, α -CD8, α -V α 8.3 und α -V β 4) im FACS analysiert. SJL/J-Wt: 2.2% der CD4⁺- und 0% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren einen TZR mit den Ketten V α 8.3 und V β 4. TCR¹⁶⁴⁰-Linie: 99.3% der CD4⁺- und 97.0% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die transgene TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4. TCR¹⁶³⁹-Linie: 75.3% der CD4⁺- und 49.5% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die transgene TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4. TCR¹⁵⁸⁶-Linie: 17.8% der CD4⁺- und 32.8% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die transgene TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4. In der mittleren Spalte ist die Expression der V α 8.3- und V β 4-Ketten auf einfach-positive CD4⁺- (rotes Gate), in der rechten Spalte die auf CD8⁺-T-Zellen (oranges Gate) dargestellt. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Thymozyten im jeweiligen Quadranten.

Es zeigte sich, dass die drei verschiedenen TZR-C3-transgenen Mauslinien eine unterschiedliche Frequenz an transgenen T-Zellen in ihrem Thymus aufwiesen. In TCR¹⁶⁴⁰-Tieren exprimierten nahezu alle Thymozyten den transgenen T-Zell-Rezeptor, in TCR¹⁶³⁹-Tieren dagegen ca. 75% bzw. in der TCR¹⁵⁸⁶-Mauslinie nur ca. 18%.

Anhand der Expression der CD4- und CD8-Corezeptoren kann man Thymozyten in drei verschiedene Reifungsstadien einteilen, beginnend mit einem CD4⁻CD8⁻ (doppelt-negativen) über ein CD4⁺CD8⁺ (doppelt-positives) und schließlich ein CD4⁺- oder CD8⁺- (einfach-positives) Stadium. Basierend auf der Gesamtzellzahl der Thymi und den Resultaten aus der FACS-Analyse konnte die absolute Anzahl der Thymozyten in den verschiedenen Stadien bestimmt werden (Siehe Abb. 5.12).

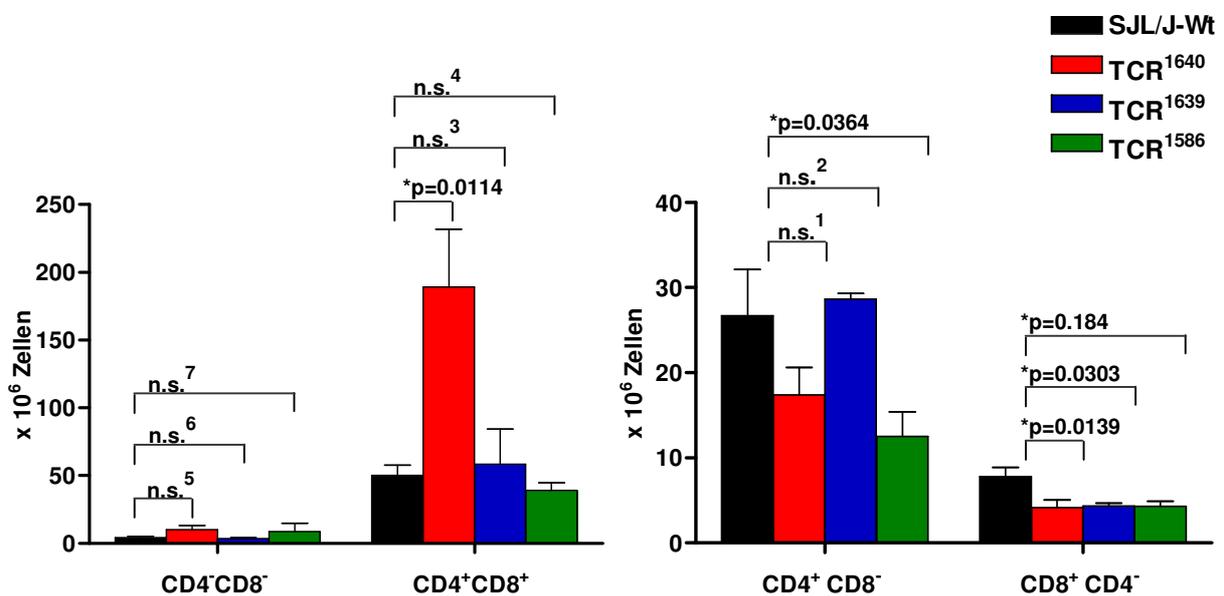


Abbildung 5.12: Anzahl der CD4⁻CD8⁻ (doppelt-negativen), CD4⁺CD8⁺ (doppelt-positiven) sowie CD4⁺- oder CD8⁺- (einfach-positiven) Thymozyten von TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt. Basierend auf der Gesamtzellzahl des Thymus und den Resultaten aus der FACS-Analyse (siehe Abb. 5.11) konnte die Anzahl CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ sowie CD4⁺- oder CD8⁺-Thymozyten bestimmt werden. SJL/J-Wt (n=5), TCR¹⁶⁴⁰- (n=7), TCR¹⁶³⁹- (n=3) und TCR¹⁵⁸⁶- (n=4); (Alter 8-10 Wochen); der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt um zu überprüfen, ob die Unterschiede signifikant waren; n.s = nicht signifikant; ¹p=0.0755; ²p=0.3977; ³p=0.3610; ⁴p=0.2076; ⁵p=0.0681; ⁶p=0.3998; ⁷p=0.2076; Fehlerindikator=SEM

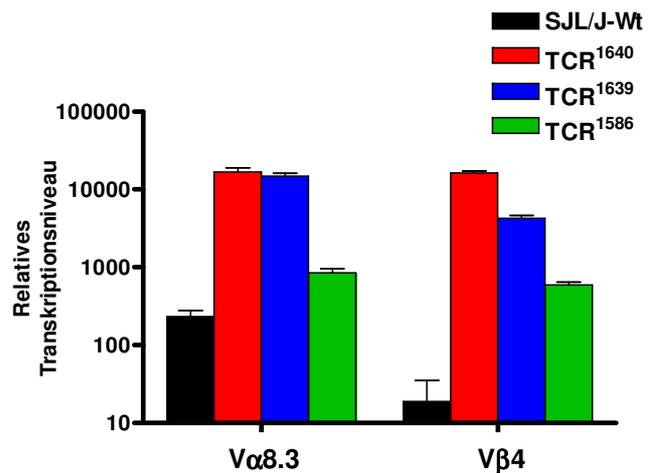
Es stellte sich heraus, dass die CD4⁺CD8⁺ (doppelt-positiv) T-Zellpopulation in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt überproportional stark vertreten war. Die Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺- (einfach-positiven) Population war aber unverändert bzw. sogar reduziert. Dies könnte darauf hinweisen, dass es im Thymus der TCR¹⁶⁴⁰-Linie zu einer selektiven Deletion der transgenen Thymozyten kommt. In allen drei TZR-C3-transgenen Linien ist die CD8⁺-T-Zellpopulation reduziert, die CD4⁺-T-Zellpopulation aber nur in der TCR¹⁵⁸⁶-Linie.

Das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis ist außer in der TCR¹⁶³⁹-Linie unverändert. In Letzterer war das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses der Thymozyten zugunsten der CD4⁺-T-Zellen verlagert, anstatt des 3/1-Verhältnis wie in SJL/J-Wt liegt es hier bei ca. 7/1 (nicht dargestellt).

Anschließend sollte das mRNA-Expressionsniveau der V α 8.3- und V β 4-Kette des TZR im Thymus der verschiedenen Mauslinien mit Real-time-PCR überprüft werden (siehe Abb. 5.13).

Abbildung 5.13:
Quantitative Real-time-PCR-Analyse der Expression der V α 8.3- und V β 4-Kette des TZR im Thymus von TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt

Gesunden, 8-10 Wochen alten Tieren der TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Linie sowie SJL/J-Wt wurde der Thymus entnommen, homogenisiert, total RNA gewonnen und die cDNA davon synthetisiert. Mit quantitativer Real-time-PCR-Analyse wurde die Expression der V α 8.3- und V β 4-Kette des TZR und GAPDH untersucht. Angegeben ist die Expressionsstärke der V α 8.3- und V β 4-Kette relativ zu GAPDH multipliziert mit 10.000. Jeder Assay wurde im Triplikat durchgeführt. Fehlerindikator=SEM

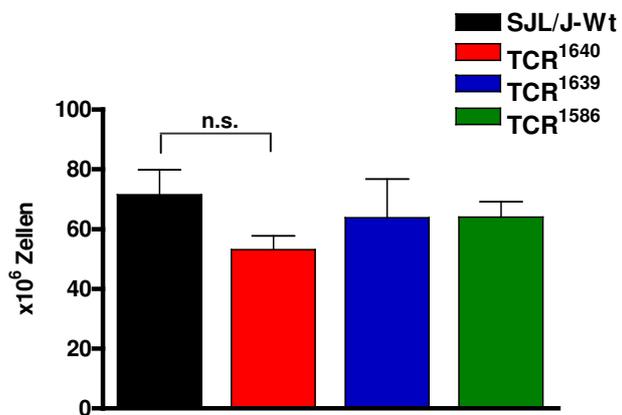


Es zeigte sich, dass auch auf der Ebene der mRNA in den drei verschiedenen Mauslinien ein gradueller Unterschied in der Expression der V α 8.3- und V β 4-Kette des TZR bestand. Die TCR¹⁶⁴⁰-Linie zeigte die stärkste mRNA-Expression beider Ketten, gefolgt von der TCR¹⁶³⁹- und der TCR¹⁵⁸⁶-Linie.

5.2.2 Oberflächen-Expression des T-Zell-Rezeptors in der Milz von TZR-C3-transgenen Mäusen

Reife, naive CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren durch die verschiedenen peripheren Lymphorgane, wie Lymphknoten und Milz. Um die Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors im peripheren Lymphsystem zu analysieren, wurde die Milz der verschiedenen transgenen Linien bzgl. Gesamtzellzahl und ihrer zellulären Zusammensetzung untersucht. Die Gesamtzellzahl der Milz in der TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Linie unterschied sich nicht von SJL/J-Wt-Mäusen (siehe Abb. 5.14).

Abbildung 5.14:
Gesamtzellzahl der Milz aus TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt
Die Milz aus SJL/J-Wt (n=7), TCR¹⁶⁴⁰- (n=7), TCR¹⁶³⁹- (n=4) und TCR¹⁵⁸⁶-Mäusen (n=5) (Alter 8-10 Wochen) wurde präpariert und die Lebendzellzahl bestimmt. Der Student t-Test (Konfidenzintervall=95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenz signifikant war. n.s.= nicht signifikant; Fehlerindikator=SEM



Anschließend wurde das FACS-Profil der transgenen T-Zellen in der Milz der drei verschiedenen Mauslinien im Vergleich zur Milz einer SJL/J-Wt-Maus analysiert. Wie bei der Analyse der Thymozyten wurden die Milzzellen dazu mit Antikörpern gegen die CD4- und CD8-Corezeptoren sowie gegen die V α 8.3- und V β 4-Kette des transgenen TZR angefärbt. Die Resultate aus der Analyse der Milz sind hier stellvertretend für Zellen aus den Lymphknoten dargestellt, da kein größerer Unterschied in der Expression des transgenen TZR zwischen Milz und Lymphknoten bestand (Daten nicht gezeigt). In beiden Organen konnte innerhalb der drei Mauslinien eine unterschiedliche Penetranz des transgenen TZR gefunden werden, wobei in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie die meisten T-Zellen den transgenen TZR exprimierten, in der TCR¹⁶³⁹-Linie ca. 30% und in der TCR¹⁵⁸⁶-Linie ca. 4% der CD4⁺-T-Zellen. Auch die CD8⁺-T-Zellen der verschiedenen Mauslinien exprimierten den transgenen TZR, aber in einem geringeren und zudem diffuseren Ausmaß. Im Unterschied zur TCR¹⁶⁴⁰-Linie gab es in den TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Linien wie in SJL/J-Wt-Tieren T-Zellen, die einfach-positiv für die V α 8.3- und V β 4-Kette waren (Abb. 5.15).

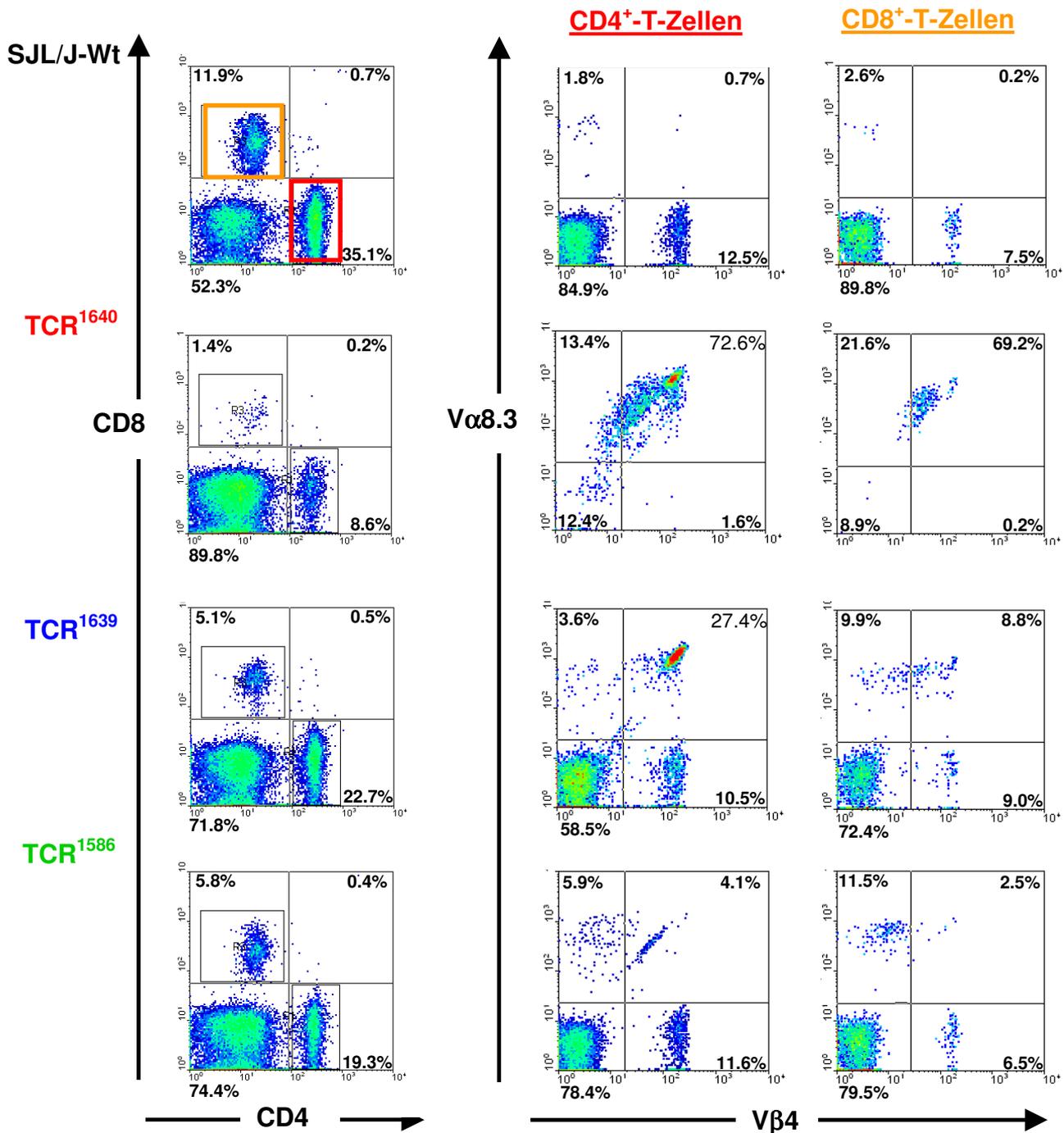


Abbildung 5.15:
FACS-Analyse von Milzzellen aus TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt
 Milzzellen der verschiedenen Mauslinien (Alter 8-10 Wochen) wurden in einer Vierfachfärbung (α -CD4, α -CD8, α -V α 8.3 und α -V β 4) im FACS analysiert.
 SJL/J-Wt: 0.7% der CD4⁺- und 0.2% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;
 TCR¹⁶⁴⁰-Line: 72.6% der CD4⁺- und 69.2% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;
 TCR¹⁶³⁹-Line: 27.4% der CD4⁺- und 8.8% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;
 TCR¹⁵⁸⁶-Line: 4.1% der CD4⁺- und 2.5% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;
 In der mittleren Spalte ist die Expression der transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten auf CD4⁺-T-Zellen (rotes Gate), in der rechten Spalte die auf CD8⁺-T-Zellen (oranges Gate) dargestellt. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten.

Mit Hilfe der zuvor bestimmten Gesamtzellzahl konnte anschließend die genaue Anzahl der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie CD19⁺-B-Zellen und CD11b⁺-Makrophagen in der Milz der verschiedenen TZR-C3-transgenen Linien bestimmt werden (siehe Abb. 5.16).

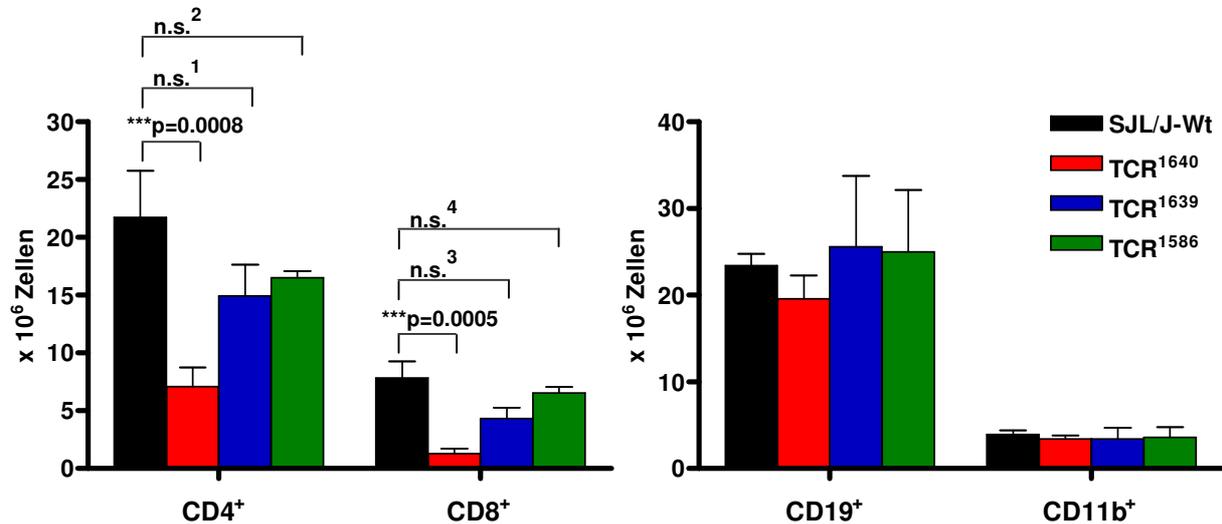


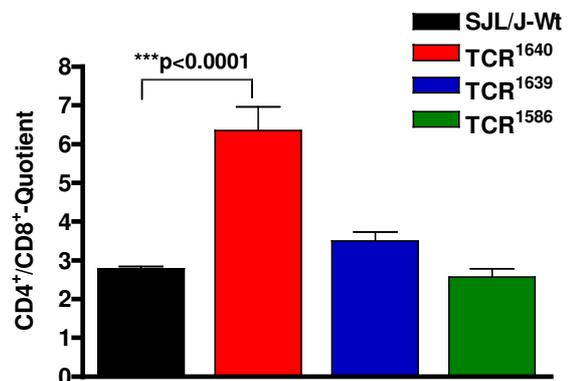
Abbildung 5.16:
Anzahl CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, CD19⁺-B-Zellen und CD11b⁺-Makrophagen in der Milz der transgenen Mäuse

Basierend auf der Gesamtzellzahl der Milz und dem Prozentsatz CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bzw. CD19⁺-B-Zellen und CD11b⁺-Makrophagen aus der FACS-Analyse, konnte die absolute Anzahl dieser Zellpopulationen in der Milz bestimmt werden. Die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulation war nur in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie verändert. Hinsichtlich der Anzahl der CD19⁺-B-Zellen und CD11b⁺-Makrophagen bestand kein Unterschied der transgenen Linien zu SJL/J-Wt-Tieren. SJL/J-Wt (n=7), TCR¹⁶⁴⁰ (n=7), TCR¹⁶³⁹ (n=4) und TCR¹⁵⁸⁶ (n=5); (Alter 8-10 Wochen); der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenzen signifikant waren. n.s.: nicht signifikant; ¹p=0.1317; ²p=0.1527; ³p=0.0626; ⁴p=0.2389; Fehlerindikator=SEM

Nur in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie war die Anzahl CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gegenüber SJL/J-Wt-Tieren signifikant reduziert und das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis der T-Zellen in dieser Linie deutlich zugunsten der CD4⁺-T-Zellen verschoben. Anstatt des 3/1-Verhältnisses wie in SJL/J-Wt ist das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren bei ca. 6/1 (siehe Abb. 5.17).

Abbildung 5.17:
CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis der T-Zellen in der Milz

Basierend auf der zuvor bestimmten Anzahl CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in der Milz, konnte das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis bestimmt werden. SJL/J-Wt (n=7), TCR¹⁶⁴⁰ (n=8), TCR¹⁶³⁹ (n=4) und TCR¹⁵⁸⁶ (n=5). Der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenz signifikant war. Fehlerindikator=SEM



5.2.3 Milzzellen von TZR-C3-transgenen Mäusen sind spezifisch für MOG₁₋₁₂₅ und MOG₉₀₋₁₁₀ und sezernieren T_H1- und T_H17-Zytokine

Naive T-Zellen reagieren auf eine erfolgreiche Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors mit Proliferation und der Sekretion bestimmter Zytokine. Letztere geben dabei Aufschluss darüber, welchen Weg eine beginnende Immunantwort einschlagen wird, entlang der Ausbildung von T_H1-, T_H2- oder auch T_H17-Effektorzellen.

Um die Reaktivität von T-Zellen aus TZR-C3-transgenen Mäusen gegenüber der rekombinant hergestellten extrazellulären Domäne von MOG, MOG₁₋₁₂₅, und MOG₉₀₋₁₁₀, dem für I-A^s immundominanten Peptid, zu analysieren, wurden Milzzellen der drei verschiedenen transgenen Linien präpariert und ein Proliferationsassay durchgeführt (siehe Abb. 5.18). Es stellte sich heraus, dass wider Erwarten die TCR¹⁶³⁹-„Medium frequency-Linie“ stärker proliferierte als die TCR¹⁶⁴⁰-„High frequency-Linie“.

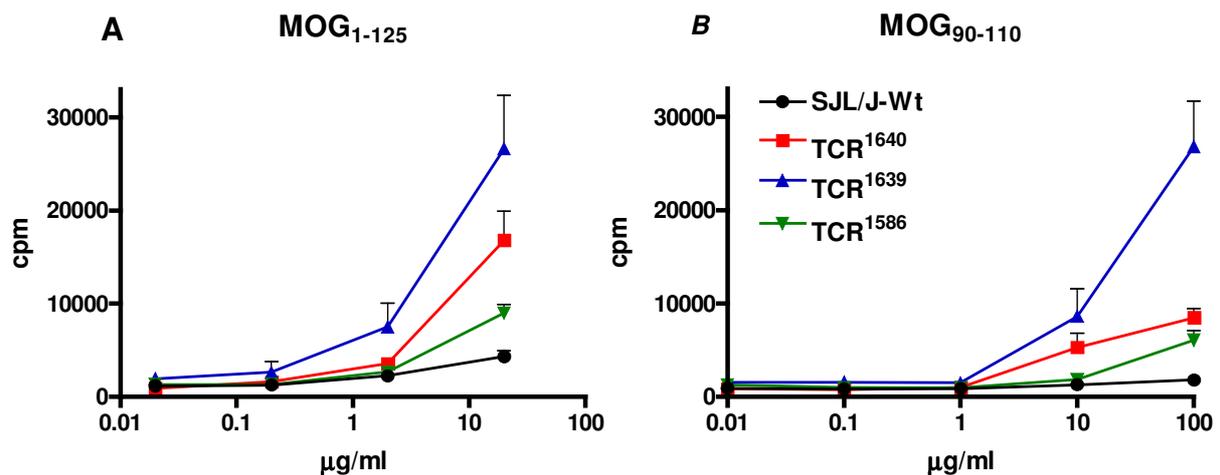


Abbildung 5.18: Proliferationsassay mit Milzzellen aus TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Wt. $2,5 \times 10^5$ Milzzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von (A) MOG₁₋₁₂₅ bzw. (B) MOG₉₀₋₁₁₀ inkubiert und ein Proliferationsassay durchgeführt. Dargestellt ist das Resultat aus je drei analysierten TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹-, TCR¹⁵⁸⁶- und SJL/J-Wt-Tieren. Jede Messung wurde im Triplikate durchgeführt. Fehlerindikator=SEM; cpm= engl.: counts per minute

Der Überstand aus den oben dargestellten Proliferationsassays wurde anschließend dazu verwendet, festzustellen, welche Zytokine von den Milzzellen der transgenen Linien nach Stimulation mit MOG₁₋₁₂₅ und MOG₉₀₋₁₁₀ sezerniert werden. Mittels Sandwich-ELISA wurde auf Anwesenheit der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie auf die T_H1-Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2 und auf das T_H17-Zytokin IL-17 getestet (siehe Abb. 5.19 und 5.20).

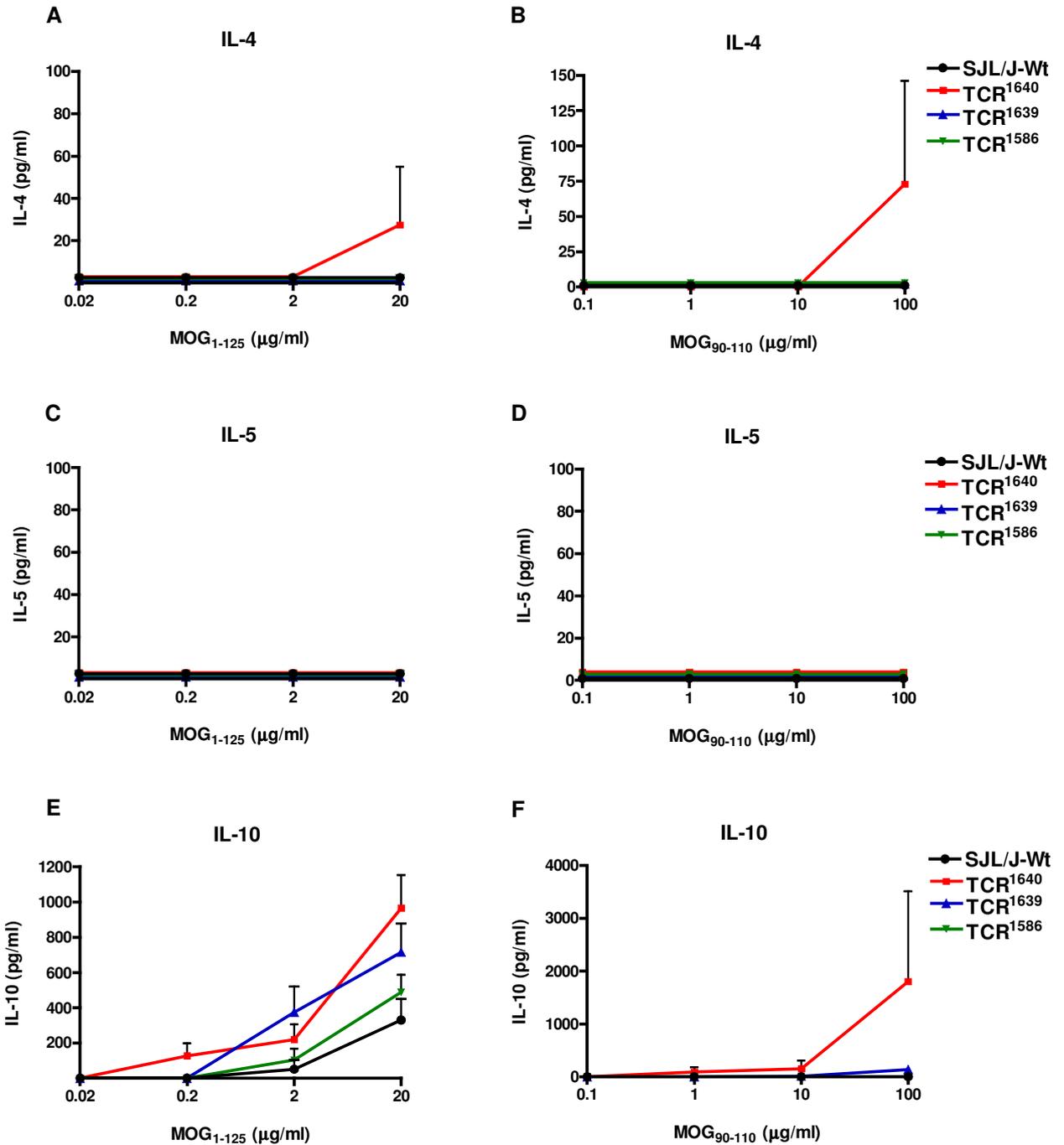


Abbildung 5.19:
Milzzellen von TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren sezernieren IL-10, aber kaum IL-4 und kein IL-5.

Die in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine aus den in Abb. 5.18 dargestellten Proliferationsassays wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die absoluten Mengen an IL-4 (A, B), IL-5 (C, D) und IL-10 (E, F) wurden anhand einer Standardkurve berechnet, in welcher das jeweilige rekombinant hergestellte Zytokin als Standard verwendet wurde. Dargestellt ist das Resultat aus je drei analysierten TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹-, TCR¹⁵⁸⁶- bzw. zwei SJL/J-Wt-Tieren, Fehlerindikator=SEM

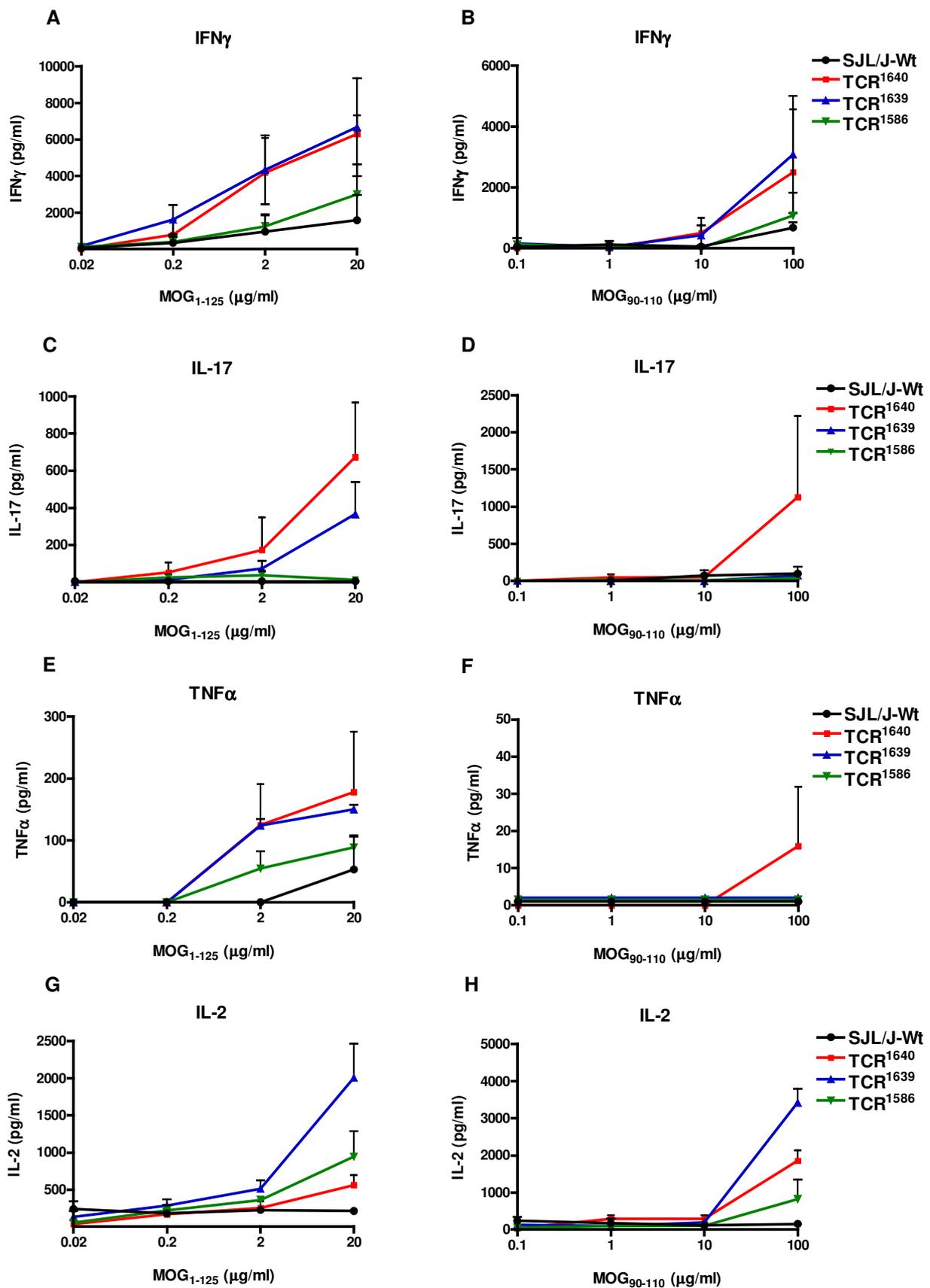


Abbildung 5.20:

Milzzellen der transgenen Tiere sezernieren die T_H1-Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2 und das T_H17-Zytokin IL-17.

Die in den Kulturüberstand sezernierten Zytokine aus den in Abb. 5.18 dargestellten Proliferationsassays wurden mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die absoluten Mengen an IFN γ (A, B), IL-17 (C, D), TNF α (E, F) und IL-2 (G, H) wurden anhand einer Standardkurve berechnet, in welcher das jeweilige rekombinant hergestellte Zytokin als Standard verwendet wurde. Dargestellt ist das Resultat aus je drei analysierten TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹-, TCR¹⁵⁸⁶- bzw. zwei SJL/J Wt-Tieren, Fehlerindikator=SEM

Das T_H2-Zytokin IL-4 konnte nur in einem der analysierten TCR¹⁶⁴⁰-Tiere detektiert werden (siehe Abb. 5.19 A und B). IL-5 konnte zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Das regulatorische Zytokin IL-10 konnte in allen drei transgenen Linien und in SJL/J-Wt nach Stimulation mit MOG₁₋₁₂₅ detektiert werden, mit MOG₉₀₋₁₁₀ jedoch nur in einem der analysierten TCR¹⁶⁴⁰-Tiere (siehe Abb. 5.19 E und F).

Wie in Abbildung 5.20 (A) und (B) dargestellt, war IFN γ unter den T_H1-Zytokinen am stärksten vertreten, wobei es interessanterweise in der TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Linie weitgehend in gleichen Konzentrationen vorlag, obwohl die TCR¹⁶³⁹-Linie stärker proliferierte als die TCR¹⁶⁴⁰-Linie. Ähnlich verhielt es sich auch mit den Zytokinen IL-17 und TNF α (siehe Abb. 5.20 C-F).

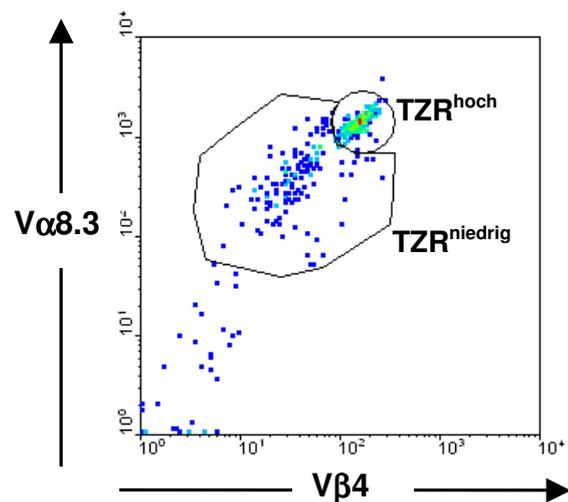
Die Mengen an IL-2, die im Überstand der aktivierten Milzzellen zu finden waren, spiegelte hingegen exakt das proliferative Potential der einzelnen transgenen Mauslinien wider. Entsprechend ihrer stärkeren Proliferation konnte in der TCR¹⁶³⁹-Linie auch eine größere Menge an IL-2 im Kulturüberstand detektiert werden als in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie (siehe Abb. 5.20 G und H).

Auch im Überstand von SJL/J-Wt-Milzzellen konnte nach Stimulation mit MOG₁₋₁₂₅ eine gewisse Menge an IFN γ , TNF α und IL-10 detektiert werden. Dies könnte auf Spuren von LPS, welches möglicherweise aufgrund der rekombinanten Herstellung von MOG₁₋₁₂₅ in der Präparation vorhanden war, zurückzuführen sein.

5.2.4 Charakterisierung der TZR^{hoch} - und $TZR^{niedrig}$ -Population innerhalb TZR -C3-transgener T-Zellen

Bei der FACS-Analyse der TCR^{1640} -Linie zum Nachweis der $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Ketten des transgenen T-Zell-Rezeptors auf $CD4^+$ -T-Zellen zeigte sich, dass anhand der Expressionsstärke des T-Zell-Rezeptors zwei Populationen, TCR^{hoch} und $TCR^{niedrig}$, voneinander unterschieden werden können (siehe Abb. 5.21). Die TCR^{hoch} -Population ist eine klar abgrenzbare T-Zellpopulation, in der beide Ketten des transgenen TZRs relativ stark exprimiert werden. Im Unterschied dazu zeigen T-Zellen der $TCR^{niedrig}$ -Population eine schwächere und zudem diffusere Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors.

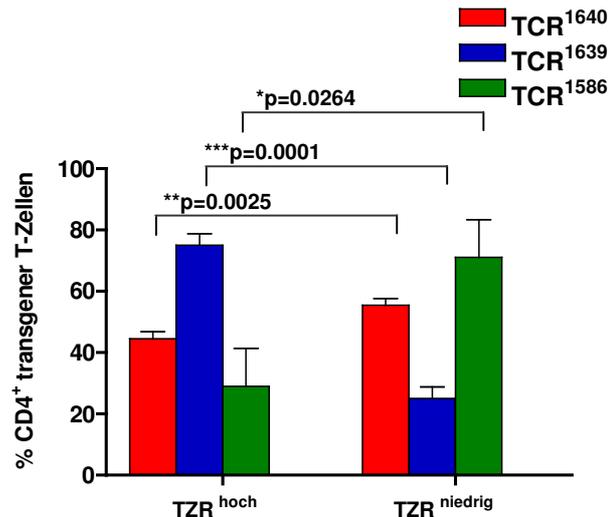
Abbildung 5.21:
Innerhalb der transgenen $CD4^+$ -T-Zellen der TCR^{1640} -Linie können zwei Populationen, TZR^{hoch} und $TZR^{niedrig}$, unterschieden werden. FACS-Analyse von Milzzellen aus der TCR^{1640} -Linie mit α - $CD4$ -, α - $CD8$ -, α - $V\alpha 8.3$ - und α - $V\beta 4$ -Antikörpern. Dargestellt ist die Expression der $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Kette des T-Zell-Rezeptors auf $CD4^+$ -T-Zellen. Die zwei markierten Regionen stellen die TZR^{hoch} - und $TZR^{niedrig}$ -Population innerhalb der transgenen $CD4^+$ -T-Zellen dar.



Für alle drei TZR -C3-transgenen Linien konnte mit Hilfe der oben beschriebenen FACS-Färbung bestimmt werden, inwiefern sich die T-Zellpopulation der Milz aus einer TZR^{hoch} - bzw. $TZR^{niedrig}$ -Population zusammensetzte (siehe Abb. 5.22). Es zeigte sich, dass die transgenen $CD4^+$ -Milzzellen von TCR^{1640} -Mäusen ca. 45% aus TZR^{hoch} - und 55% aus $TZR^{niedrig}$ -Zellen bestanden. Die transgenen $CD4^+$ -T-Zellen der TCR^{1639} -Linie setzen sich überwiegend aus TZR^{hoch} -Zellen (ca. 75%) zusammen. Hingegen besaß die TCR^{1586} -, wie die TCR^{1640} -Linie, zu etwa gleichen Teilen T-Zellen der TZR^{hoch} - und $TZR^{niedrig}$ -Population.

Abbildung 5.22:
Zusammensetzung der transgenen CD4⁺-T-Zellen der Milz aus einer TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Population

In einer FACS-Analyse mit α -V α 8.3-, α -V β 4- und α -CD4-Antikörpern konnte mit Hilfe der in Abb. 5.21 dargestellten Regionen für die TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Population der Anteil dieser Zellen innerhalb der transgenen CD4⁺-T-Zellen ermittelt werden. TCR¹⁶⁴⁰- (n=7), TCR¹⁶³⁹- (n=4) und TCR¹⁵⁸⁶- (n=4); (Alter ca. 10 Wochen); der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenz signifikant war.



Da es im Thymus der transgenen Tiere keine deutliche TZR^{hoch}- bzw. TZR^{niedrig}-Population, sondern vor allem TZR^{hoch}-Zellen gab, könnte diese Herunterregulation des T-Zell-Rezeptors in der Milz ein Zeichen für einen veränderten Aktivierungsstatus der T-Zellen sein. Um zu klären, ob sich die TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Populationen hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus voneinander unterscheiden, wurden sie bzgl. der Expression des Aktivierungsmarkers CD62L untersucht (siehe Abb. 5.23).

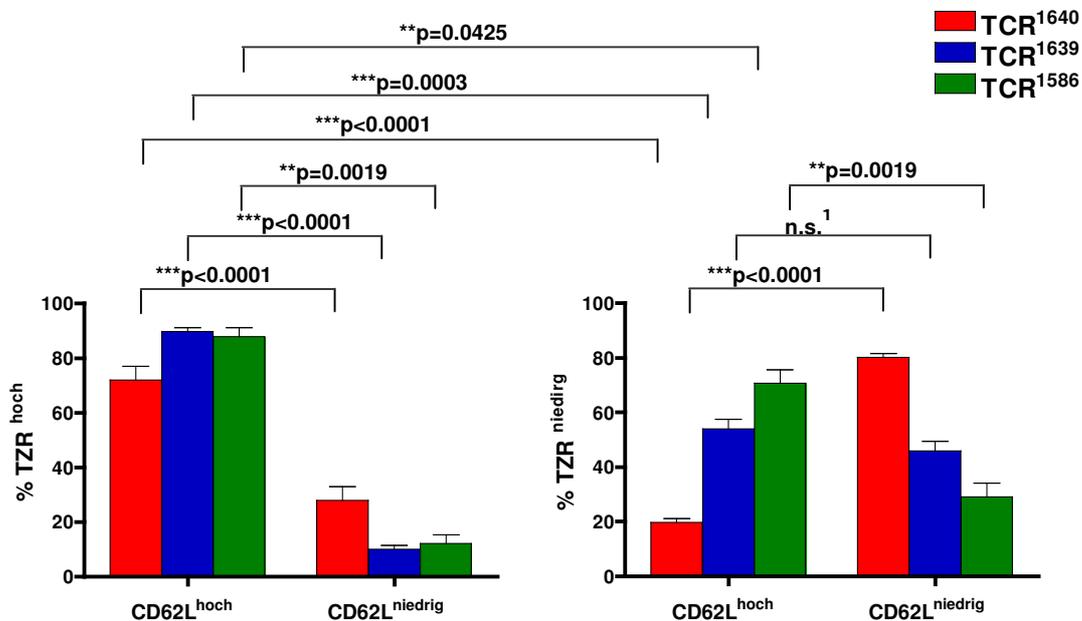


Abbildung 5.23:
Oberflächenexpression von CD62L auf TZR-C3-transgenen Milzzellen der TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Population

Mittels FACS-Analyse mit α -V α 8.3-, α -V β 4-, α -CD4- und α -CD62L-Antikörpern konnte der Anteil CD62L^{hoch}- und CD62L^{niedrig}-Zellen innerhalb der TZR^{hoch}- (linke Grafik) und TZR^{niedrig}- (rechte Grafik) Populationen bestimmt werden. TCR¹⁶⁴⁰ (n=6), TCR¹⁶³⁹ (n=3) und TCR¹⁵⁸⁶ (n=3); (Alter ca. 10 Wochen); der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenzen signifikant waren. ¹p=0,0902

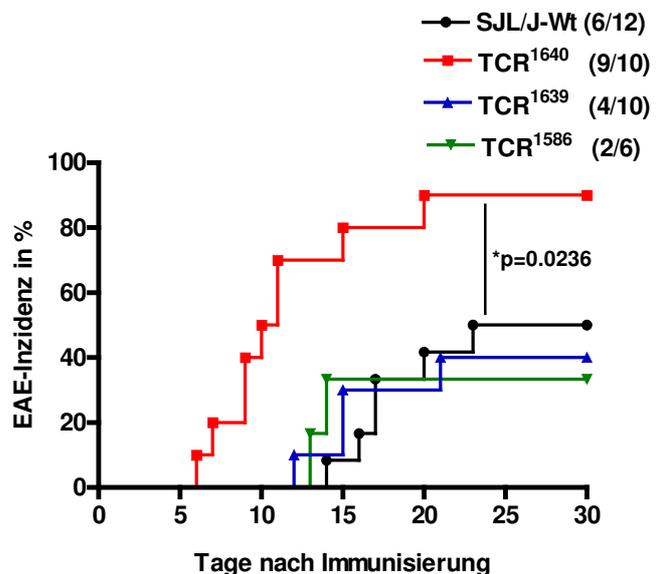
Außerdem wurde die TZR^{hoch} - und $TZR^{niedrig}$ -Population auf Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und CD44 untersucht, was ein ähnliches Resultat bezüglich der Verteilung von naiven und aktivierten T-Zellen ergab: Die TZR^{hoch} - und die $TZR^{niedrig}$ -Population zeichneten sich durch einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus aus. In allen drei transgenen Mauslinien waren in der TZR^{hoch} -Population überwiegend naive T-Zellen vorhanden, in der $TZR^{niedrig}$ -Population dagegen mehr aktivierte T-Zellen. Am deutlichsten kam dies in der TCR^{1640} -Linie zum Tragen, in der ca. 80% der $TZR^{niedrig}$ -T-Zellen einen aktivierten Phänotyp hatten.

5.2.5 Nur TCR^{1640} -Mäuse zeigen nach Immunisierung mit MOG_{1-125} bzw. CFA eine erhöhte EAE-Inzidenz

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit der transgenen MOG-spezifischen T-Zellen Auswirkungen auf die Anfälligkeit der Tiere gegenüber einer EAE-Induktion hatte, wurden zwei bis drei Monate alte Weibchen der drei Linien mit MOG_{1-125} in CFA immunisiert. Zudem wurde am 1. und 3. Tag der Immunisierung Pertussistoxin (P.tx.) appliziert. Das Auftreten von EAE in Prozent zur Gesamtzahl immunisierter Tiere ist in Abbildung 5.24 dargestellt.

Abbildung 5.24:
Nur die TCR^{1640} -Linie zeigte nach Immunisierung mit MOG_{1-125} /CFA/P.tx. eine erhöhte EAE-Inzidenz.

Zwei bis drei Monate alte Weibchen von TCR^{1640} (n=10), TCR^{1639} (n=10), TCR^{1586} (n=6) und SJL/J-Wt (n=12) wurden mit 200 μ g MOG_{1-125} in CFA (3 mg/ml Mykobakterium tuberculosis H37RA) subkutan immunisiert. Zudem wurde am 1. und 3. Tag der Immunisierung Pertussistoxin (je 200 ng) appliziert. Die Y-Achse gibt die Inzidenz der aufgetretenen EAE in Prozent zur Gesamtzahl immunisierter Tiere an. Auf der X-Achse sind die Tage nach der Immunisierung dargestellt.



Es stellte sich heraus, dass im Vergleich zu SJL/J-Tieren nur Mäuse aus der TCR^{1640} -Linie, nicht aber aus der TCR^{1639} - oder TCR^{1586} -Linie nach Immunisierung mit MOG_{1-125} /CFA/P.tx. eine erhöhte EAE-Inzidenz hatten. In 90% der Tiere aus der TCR^{1640} -Linie konnte mit dieser Immunisierung EAE induziert werden, aber nur in ca. 50% der Tiere aus den anderen Linien

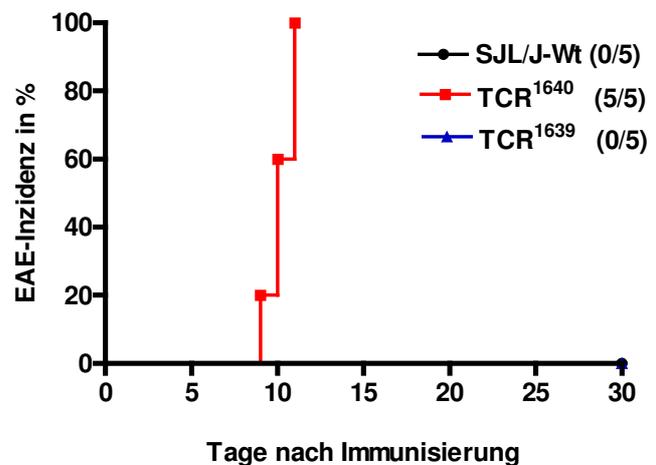
bzw. in SJL/J-Wt. Zudem traten in immunisierten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren die ersten klinischen Anzeichen deutlich früher auf als in SJL/J-Wt-Tieren: TCR¹⁶⁴⁰ 10.9 ± 1.4 d und SJL/J-Wt 17.6 ± 1.4 d. Überraschend war, dass sich Tiere der TCR¹⁶³⁹-Linie, in der ca. 30% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den MOG-spezifischen TZR exprimierten, nicht anfälliger gegenüber der EAE-Induktion verhielten als SJL/J-Wt-Tiere. Der Verlauf der induzierten EAE in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren folgte einem sehr akuten, progredienten Verlauf im Unterschied zum überwiegend schubförmig-remittierenden Verlauf in immunisierten SJL/J-Wt-Tieren (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der erkrankten Tiere aus jeder Linie unterschied sich das maximale Ausmaß der klinischen Erkrankung nicht, sondern entsprach in allen Fällen einer relativ starken EAE (EAE-Grad von 3-4 (nicht dargestellt)).

Anschließend sollte überprüft werden, welchen Effekt eine Immunisierung mit CFA und Pertussistoxin alleine, ohne MOG₁₋₁₂₅, auf die TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Linie im Vergleich zu SJL/J-Wt hatte. Das Auftreten von EAE nach einer CFA/P.tx-Immunisierung in Prozent zur Gesamtzahl der immunisierten Tiere ist in Abbildung 5.25 dargestellt.

Abbildung 5.25:
In der TCR¹⁶⁴⁰-Linie konnte bereits durch Immunisieren mit CFA und Pertussistoxin EAE induziert werden.

Zwei bis drei Monate alte Weibchen von TCR¹⁶⁴⁰ (n=5), TCR¹⁶³⁹ (n=5) und SJL/J-Wt (n=5) wurden subkutan mit CFA (3 mg/ml Mykobakterium tuberculosis H37RA) immunisiert. Zudem wurde am 1. und 3. Tag der Immunisierung Pertussistoxin (je 200 ng) i. p. appliziert.

Die Y-Achse gibt die EAE-Inzidenz in Prozent zur Gesamtzahl immunisierter Tiere an. Auf der X-Achse sind die Tage nach der Immunisierung dargestellt.



In allen TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, jedoch weder in TCR¹⁶³⁹- noch SJL/J-Wt-Tieren, konnte mit einer CFA/P.tx.-Immunisierung EAE hervorgerufen werden. Die ersten klinischen Anzeichen nach der CFA/P.tx.-Immunisierung zeigten sich in den Tieren zu etwa derselben Zeit (10,2 ± 0.4 d) wie nach der Immunisierung mit MOG₁₋₁₂₅/CFA/P.tx. (10.9 ± 1.4 d; siehe Abb. 5.24). Auch hinsichtlich des maximalen Erkrankungsgrads der EAE bestand zwischen CFA/P.tx.-immunisierten (EAE_{Max} = 4.0 ± 0.4) und MOG₁₋₁₂₅/CFA/P.tx.-immunisierten (EAE_{Max} = 4.7 ± 0.1) Tieren kein signifikanter Unterschied (Daten nicht gezeigt).

5.3 Spontane EAE in TZR-C3-transgenen Tieren – die RR-Maus

5.3.1 TZR-C3-transgene SJL/J-Mäuse entwickeln spontane EAE

In den von Bettelli et al. (2003) erzeugten MOG₃₅₋₅₅-spezifischen TZR-transgenen C57BL/6-Mäusen trat nur in einem geringen Ausmaß (4%) spontane EAE auf. Im Unterschied dazu war die Häufigkeit der spontanen EAE in den von Waldner et al. (2000) erzeugten PLP₁₃₉₋₁₅₁-spezifischen TZR-transgenen Mäusen auf dem SJL/J-Hintergrund so hoch, dass die Linien nicht weitergeführt werden konnten. Wie die oben beschriebene Charakterisierung der TZR-C3-SJL/J-Mäuse zeigte, hatten diese Tiere in ihrem T-Zell-Repertoire funktionelle und wie im Fall der TCR¹⁶⁴⁰-Linie auch sehr abundante autoaggressive T-Zellen. Deshalb wurden Tiere der drei verschiedenen TZR-C3-transgenen Linien in einem Beobachtungszeitraum von mindestens 6 Monaten hinsichtlich der Ausbildung spontaner EAE untersucht und jeden zweiten Tag gewogen. Der Gewichtsverlauf einer Maus spiegelt den klinischen EAE-Krankheitsverlauf sehr genau wider bzw. tritt in den Tieren meist sogar vor den ersten klinischen Symptome bereits ein deutlicher Gewichtsverlust auf. Es zeigte sich, dass die meisten der TCR¹⁶⁴⁰-Tiere (92% der Weibchen und 74% der Männchen) während der ersten 6 Lebensmonate spontan EAE entwickelten. MOG-defiziente TCR¹⁶⁴⁰-Tiere, TCR¹⁶⁴⁰ x MOG^{-/-}, zeigten hingegen keine spontane EAE. Auch in der TCR¹⁶³⁹-Linie konnte zu keiner Zeit spontane EAE beobachtet werden, interessanterweise aber in ca. 30% der Tiere aus der TCR¹⁵⁸⁶-Linie (siehe Tab. 5.26).

SJL/J	EAE-Inzidenz	Beginn (in Wochen)	Schweregrad (in EAE-Grad)
TCR¹⁶⁴⁰			
TCR ¹⁶⁴⁰ (w)	91.6% (11/12)	15.9 ± 1,5	4.0 ± 0.33 (n=11)
TCR ¹⁶⁴⁰ (m)	74.1% (20/27)	15.0 ± 3.45	4.2 ± 1.1 (n=20)
TCR ¹⁶⁴⁰ x MOG ^{-/-} (w/m)	0% (0/3)	-	-
TCR¹⁶³⁹			
TCR ¹⁶³⁹ (w)	0% (0/22)	-	-
TCR ¹⁶³⁹ (m)	0% (0/15)	-	-
TCR¹⁵⁸⁶			
TCR ¹⁵⁸⁶ (w)	5.5% (1/18)	18.3	4 (n=1)
TCR ¹⁵⁸⁶ (m)	30.0% (5/15)	26.6 ± 5.5	4.4 ± 0.48 (n=5)

Tabelle 5.26:

Inzidenz, Beginn und Schweregrad der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-SJL/J-Tieren
 TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J: 91.6% der Weibchen und 74% der Männchen entwickelten spontane EAE, nicht aber MOG-defiziente TCR¹⁶⁴⁰xMOG^{-/-}-SJL/J-Tiere. In TCR¹⁶³⁹-Tieren konnte in dem Beobachtungszeitraum keine spontane EAE beobachtet werden. In TCR¹⁵⁸⁶-Tieren trat in ca. 6% der Weibchen und 30% der Männchen spontane EAE auf, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt als in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren. (w)= weiblich; (m)= männlich

Um einen möglichen Einfluss genetischer Faktoren auf das Auftreten spontaner EAE zu untersuchen, wurde die TCR¹⁶⁴⁰-Linie außer auf den SJL/J-Stamm, der als EAE anfällig bekannt ist (Brown and McFarlin, 1981; Lublin et al., 1981), auch auf den B10.S-Stamm zurückgekreuzt. B10.S-Tiere haben den genetischen Hintergrund der relativ EAE-resistenten C57BL/10SnSg Tiere, ihr MHC-Haplotyp ist aber wie SJL/J-Mäusen, H-2^S (Chang et al., 1999). Während die Mehrzahl der TCR¹⁶⁴⁰-Tiere auf dem SJL/J-Stamm spontane EAE entwickelte, trat in den TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren spontane EAE nur in einem von insgesamt 39 Tieren auf (siehe Tabelle 5.27).

B10.S-TCR¹⁶⁴⁰	EAE-Inzidenz	Beginn (in Wochen)	Schweregrad (in EAE-Grad)
TCR ¹⁶⁴⁰ (w)	0% (0/15)	-	-
TCR ¹⁶⁴⁰ (m)	4.2% (1/24)	11,1	4 (n=1)

Tabelle 5.27:

Inzidenz, Beginn und Schweregrad der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren

In TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren konnte in dem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten nur in einem Fall spontane EAE beobachtet werden. (w)= weiblich; (m)= männlich

Studien mit T-Zellen aus TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren zeigten, dass der transgene TZR auch in diesem Stamm funktionell war, d.h. die Fähigkeit besaß, nach antigenspezifischer Stimulation die Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen (IL-2, IFN γ und IL-17) einzuleiten (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise unterschied sich aber das Expressionsprofil des transgenen T-Zell-Rezeptors abhängig davon, ob der TCR¹⁶⁴⁰-Founder auf den SJL/J- oder den B10.S-Stamm zurückgekreuzt worden war. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, exprimierten in TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren nur jeweils 50% bzw. 33% der CD4⁺-T-Zellen des Thymus und der Milz den transgenen TZR, wohingegen in TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren in beiden Organen nahezu alle CD4⁺-T-Zellen den transgenen TZR exprimierten (siehe Abb. 5.11 und 5.15), obwohl beide Stämme von ein und demselben TCR¹⁶⁴⁰-FVB-Founder abstammten. Darüber hinaus war das Verhältnis der CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen in den TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren nicht so stark auf die Seite der CD4⁺-T-Zellen verschoben wie in TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren und es gab darüber hinaus nur T-Zellen der TZR^{hoch}-Population und nicht wie in entsprechenden SJL/J-Tieren eine TZR^{hoch}- und eine TZR^{niedrig}-Population (vgl. Abb. 5.21). Insofern verhielt sich die TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Linie eher wie die TCR¹⁶³⁹-SJL/J-Linie, in der interessanterweise auch kaum spontane EAE beobachtet werden konnte.

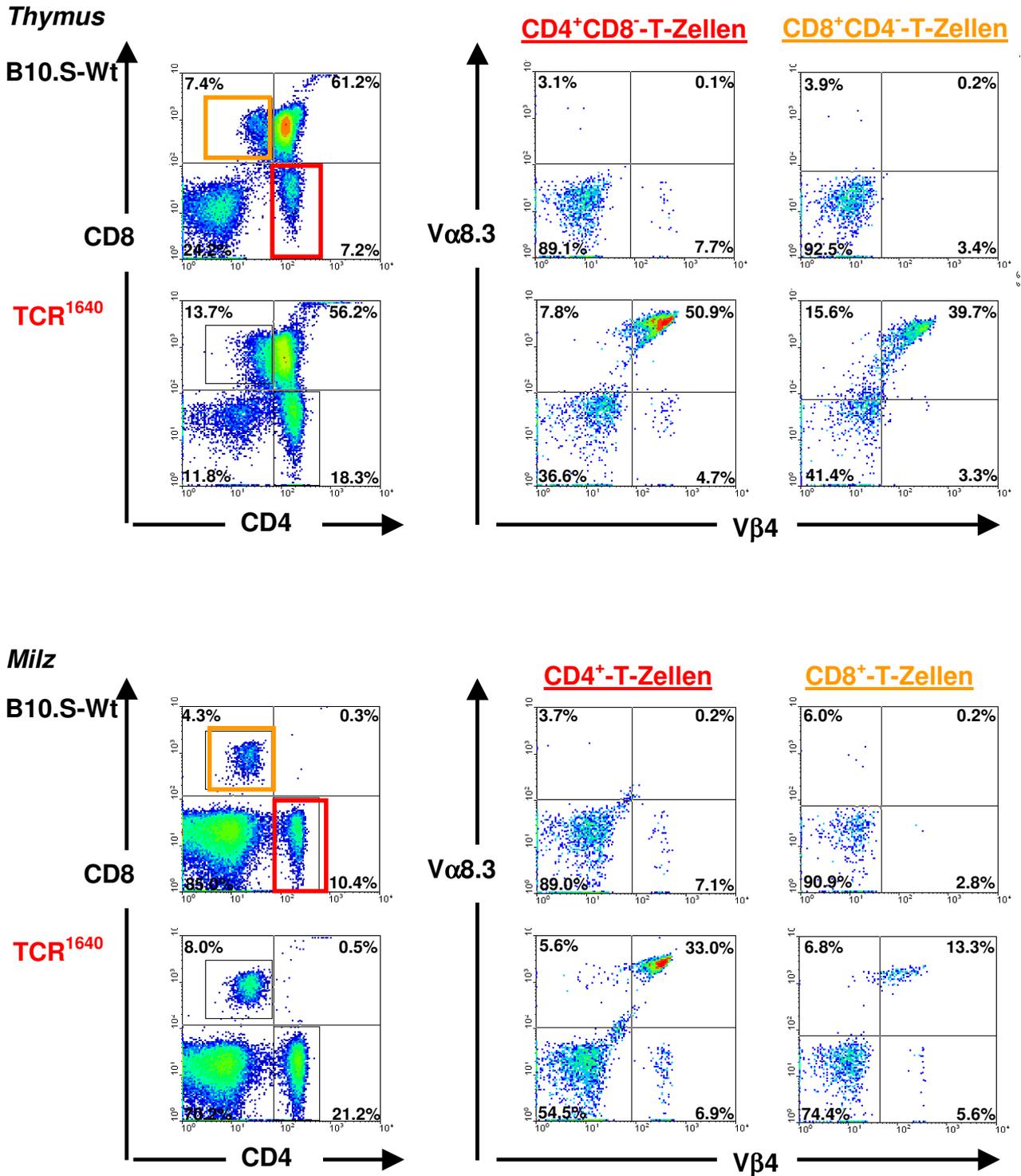


Abbildung 5.28:

FACS-Analyse von Thymozyten und Milzzellen aus TCR¹⁶⁴⁰-B10.S- im Vergleich zu B10.S-Wt-Tieren
 Thymozyten und Milzzellen der verschiedenen Mauslinien (Alter 8-10 Wochen) wurden in einer Vierfachfärbung (α -CD4, α -CD8, α -V α 8.3 und α -V β 4) im FACS analysiert.

Thymus: B10.S-Wt: 0.1% der einfach-positiven CD4⁺- und 0.2% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4; **TCR¹⁶⁴⁰-B10.S:** 50.9% der einfach-positiven CD4⁺- und 39.7% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;

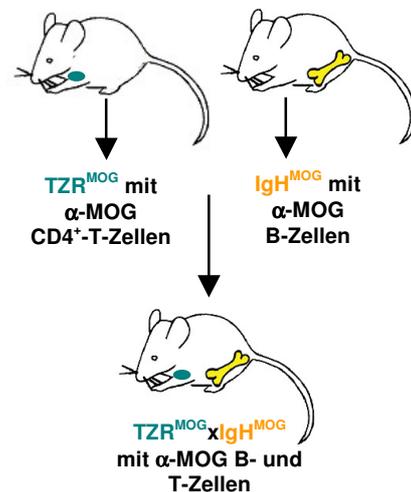
Milz: B10.S-Wt: 0.2% der CD4⁺- und 0.2% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4; **TCR¹⁶⁴⁰-B10.S:** 33.0% der CD4⁺- und 13.3% der CD8⁺-T-Zellen koexpressieren die TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4;

In der mittleren Spalte ist die Expression der transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten auf CD4⁺-T-Zellen (rotes Gate), in der rechten Spalte die auf CD8⁺-T-Zellen (orangefarbenes Gate) dargestellt. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten.

Seit den Arbeiten von Waldner et al. (2004) war außerdem bekannt, dass der Aktivitätsstatus der antigenpräsentierenden Zellen in B10.S-Tieren im Vergleich zu SJL/J-Mäusen reduziert ist, was sich u.a. in einem verringerten Expressionsniveau von MHC-Klasse-II auf B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen widerspiegelt. Auch aus eigenen Experimenten ging hervor, dass Milzzellen aus beiden Stämmen, SJL/J und B10.S, als APCs für eine Restimulation des C3-T-Zellklons verwendet werden können, dass APCs aus SJL/J-Tieren jedoch eine stärkere Proliferation der T-Zellen anregen als solche aus B10.S-Tieren (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Spontane EAE in doppelt-transgenen $TZR^{MOG} \times IgH^{MOG}$ -SJL/J-Mäusen

Von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) war bekannt, dass in C57BL/6-Tieren spontane EAE wesentlich häufiger (von 4% auf 50%) auftrat, wenn die Tiere außer einem MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor (2D2-Maus, Bettelli et al., 2003) zusätzlich transgen für die schwere Kette des pathogenen MOG-spezifischen Antikörpers 8.18C5 waren. Dies wurde durch Verpaaren der TCR^{MOG} -2D2-Tiere mit IgH^{MOG} -C57BL/6 zu einer doppelt-positiven F1-Generation, $TCR^{MOG} \times IgH^{MOG}$



die sogenannten Devic-Tiere, erreicht (siehe Paarungsschema). IgH^{MOG} -Tiere sind „Knock-In“-Tiere, in denen die schwere Kette des MOG-spezifischen, demyelinisierenden Antikörpers 8.18C5 anstelle der endogenen J_H -Sequenz integriert ist (Litzenburger et al., 1998). Die B-Zellen dieser Tiere sekretieren große Mengen des pathogenen Antikörpers, die Tiere selbst zeigten aber zu keiner Zeit spontane EAE, weder in C57BL/6 noch in SJL/J.

Um den Effekt von transgenen MOG-spezifischen B-Zellen und Antikörpern in den TZR-C3-transgenen SJL/J-Mäusen zu studieren, wurden alle drei Mauslinien mit IgH^{MOG} -SJL/J-Tieren verpaart. Die doppelt-positive F1-Generation wurde dann hinsichtlich der Ausbildung spontaner EAE untersucht (Tabelle 5.29). Im Unterschied zu C57BL/6- hatte in SJL/J- und B10.S-Tieren das Verpaaren der TZR-transgenen Tiere mit IgH^{MOG} zu einer doppelt-transgenen F1-Generation, die MOG-spezifische T- und B-Zellen sowie Antikörper hatte, kaum einen Effekt auf die Ausbildung spontaner EAE.

SJL/J	EAE-Inzidenz	Beginn (in Wochen)	Schweregrad (in EAE-Grad)
TCR¹⁶⁴⁰			
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (w)	100% (20/20)	15.6 ± 1.8	3.53 ± 0.19 (n=19)
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (m)	73.1% (19/26)	19.7 ± 2.4	3.66 ± 0.26 (n=19)
TCR¹⁶³⁹			
TCR ¹⁶³⁹ x IgH ^{MOG} (w)	14.2% (1/7)	11.0	3 (n=1)
TCR ¹⁶³⁹ x IgH ^{MOG} (m)	0% (0/10)	-	-
TCR¹⁵⁸⁶			
TCR ¹⁵⁸⁶ x IgH ^{MOG} (w)	0% (0/8)	-	-
TCR ¹⁵⁸⁶ x IgH ^{MOG} (m)	0% (0/3)	-	-
B10.S			
TCR¹⁶⁴⁰			
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (w)	14.3% (1/7)	20.1	2 (n=1)
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (m)	0% (0/8)	-	-

Tabelle 5.29:

Inzidenz, Beginn und Schweregrad der spontanen EAE in doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}, TCR¹⁶³⁹ x IgH^{MOG} und TCR¹⁵⁸⁶ x IgH^{MOG} in SJL/J und B10.S

In TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren trat spontane EAE in 100% der Weibchen und 73% der Männchen auf. In TCR¹⁶³⁹ x IgH^{MOG}-SJL/J konnte nur in einem Tier, in TCR¹⁵⁸⁶ x IgH^{MOG}-SJL/J jedoch zu keiner Zeit spontane EAE beobachtet werden. In TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-B10.S-Tieren konnte spontane EAE nur in einem Fall beobachtet werden. (w)= weiblich; (m)= männlich

Nachfolgende Abbildung zeigt die Inzidenz der spontanen EAE in einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren im Vergleich zu doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}. Weder in der Inzidenz noch bzgl. des Beginns der spontanen EAE bestand ein Unterschied zwischen einfach- und doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren.

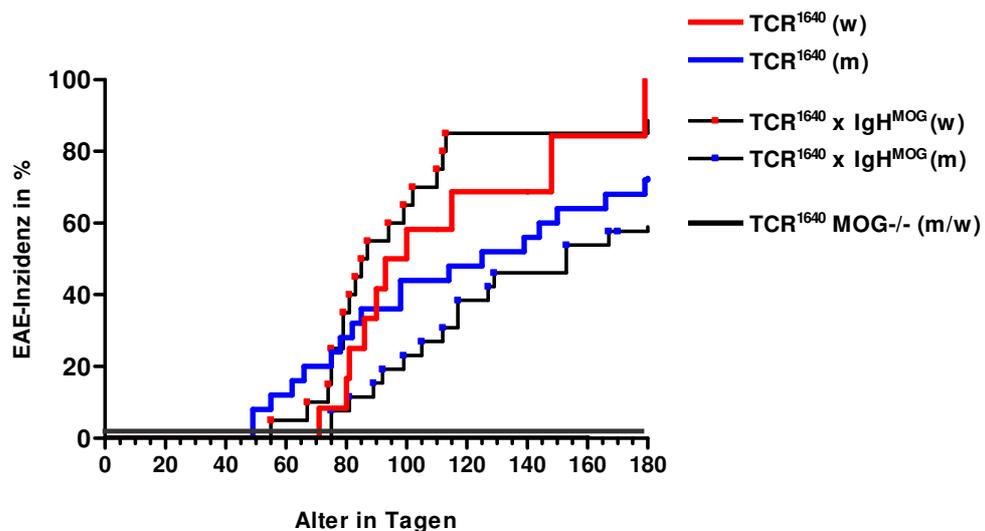


Abbildung 5.30:

Graphische Darstellung der Inzidenz der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰-, TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- und TCR¹⁶⁴⁰ x MOG^{-/-}-SJL/J

In einfach- und doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren trat die spontane EAE durchschnittlich 15 Wochen nach der Geburt auf, wobei der Zeitpunkt des Auftretens der ersten EAE-Symptome in den einzelnen Tieren stark variierte, zwischen 40 und 150 Tagen. In den fünf über vier Monate alten TCR¹⁶⁴⁰ x MOG^{-/-}-Tieren konnte keine spontane EAE beobachtet werden. (w)= weiblich; (m)= männlich

5.3.3 Die spontane EAE folgt einem progredienten oder schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf

Die spontane EAE der erkrankten SJL/J-Tiere folgte entweder einem progredienten, meist aber einem schubförmig-remittierenden Verlauf, weshalb die Tiere auch als *RR-Mäuse* bezeichnet wurden (engl.= *relapsing-remitting*). Im schubförmig-remittierenden Verlauf konnten zwei Varianten unterschieden werden, je nachdem, ob die Remission zwischen zwei Schüben vollständig oder nur partiell verlief. Im ersten Fall folgte auf die erste Erkrankungsphase eine Zeitspanne, in der das Tier äußerlich symptomfrei war, wohingegen in einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit partieller Remission in der Remissionsphase Lähmungserscheinungen zurückblieben. Im Folgenden sind die einzelnen Verlaufsformen der spontanen EAE in SJL/J-Tieren anhand exemplarischer Gewichts- und Krankheitsverläufe dargestellt. Filmsequenzen, die die verschiedenen Verlaufsformen der spontanen EAE widerspiegeln, sind auf beiliegender CD zu finden.

a.) Schubförmig-remittierender Verlauf mit vollständiger Remission

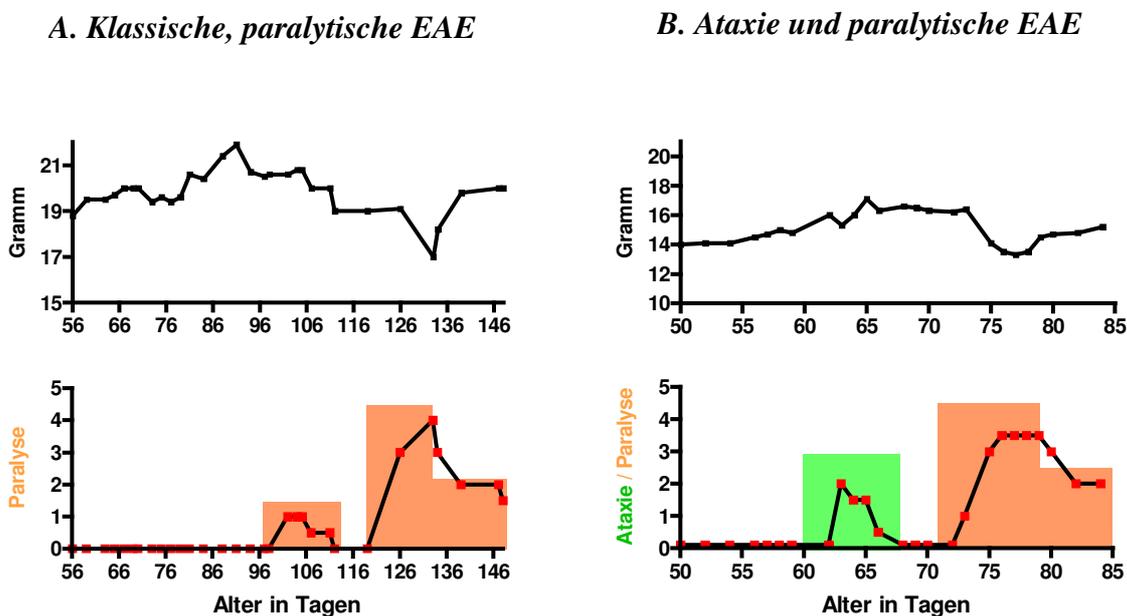


Abbildung 5.31:

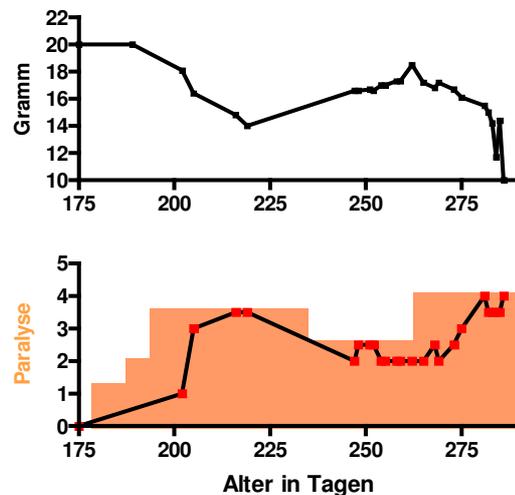
Schubförmig-remittierender Verlauf der spontanen EAE mit vollständiger Remission

Folgte die spontane EAE einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit vollständiger Remission, war die erste Krankheitsphase entweder wie in **(A)** eine vergleichsweise schwache, **paralytische EAE** mit einem max. Krankheitsgrad von ca. 1,5 (z.B. #8511 TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}), oder sie war geprägt wie in **(B)** von mitunter sehr stark ausgebildeter **Ataxie** (ataxische Phase grün unterlegt), aber ohne Paralyseerscheinungen (z.B. #6490 TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}). Diese erste Erkrankungsphase dauerte im Schnitt 2-3 Tage. Anschließend folgte eine Zeit äußerlich vollständiger Remission, an die sich (in ca. 7-21 Tagen) ein erster Rückfall aus zumeist klassischer, paralytischer EAE anschloss. Auch auf diesen ersten Rückfall konnte eine erneute, meist aber nur partielle Remission folgen. Die obere Grafik gibt den jeweiligen Gewichtsverlauf, die untere den EAE-Krankheitsgrad (klassische, paralytische EAE-Krankheitsphasen orange unterlegt) wieder. Krankheitsverläufe exemplarischer Mäuse für **(A)** und **(B)** sind in Filmsequenzen auf beigelegter CD dargestellt.

b.) Schubförmig-remittierender Verlauf mit partieller Remission

Abbildung 5.32:
Schubförmig-remittierender Verlauf mit partieller Remission

Folgte die spontane EAE einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit partieller Remission, war die erste Krankheitsphase meist von starker klassischer, paralytischer EAE (EAE-Grad von 3-4) geprägt. Auf diese meist mehrere Tage andauernde Lähmungsphase konnte eine Zeit mit partieller Remission folgen, in der sich die Maus deutlich, aber nicht vollständig erholte (EAE-Grad von 1,5–2,5). In dieser partiellen Remissionsphase konnte das Tier mitunter mehrere Wochen stabil verharren, bis es zu einem ersten Rückfall aus zumeist paralytischer EAE (EAE-Grad von 3-5) kam, der mitunter auch zum Tod des Tieres führen konnte. Die obere Grafik gibt den Gewichtsverlauf, die untere den EAE-Krankheitsgrad wieder (paralytische EAE-Krankheitsphasen orange unterlegt; am Beispiel #8577 TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}). Siehe Filmsequenz auf beigelegter CD.

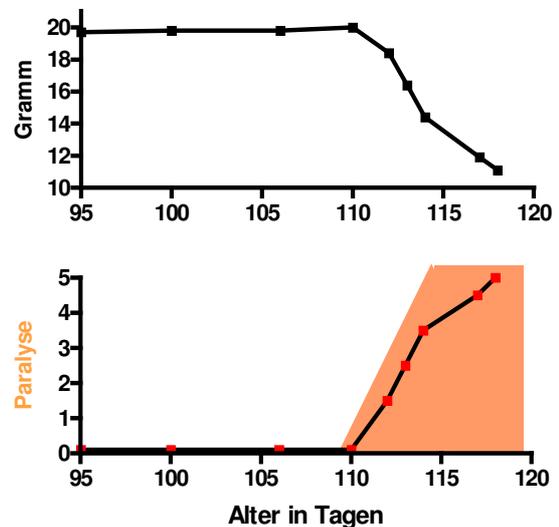


c.) Progredienter Verlauf der spontanen EAE

Abbildung 5.33:
Progredienter Verlauf der spontanen EAE

Beim progredienten Verlauf der spontanen EAE (z.B. #8572 TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}) entwickelte sich zumeist innerhalb weniger Tage eine klassische EAE (EAE-Grad von 3-5), z.T. begleitet von starker Ataxie und/oder Spastiken. Es folgte zu keiner Zeit eine klinische Remission, zum Teil aber eine Stabilisierung dieses Krankheitszustands über mehrere Wochen. Die obere Grafik gibt den Gewichtsverlauf, die untere den EAE-Krankheitsgrad wieder (klassische, paralytische EAE-Krankheitsphasen orange unterlegt). Siehe Filmsequenz auf beigelegter CD. Mitunter trat auch nach wenigen Tagen der Tod ein.

In seltenen Fällen kam es auch zur Ausbildung einer schwächeren, chronischen EAE (EAE von ≤ 2), in der das Tier über Monate hinweg eine Paralyse des Schwanzes und eine Hinterbeinschwäche aufwies (nicht dargestellt).



Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung der verschiedenen Varianten der spontanen EAE in kranken TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren. Hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen Verlaufsformen der spontanen EAE bestand zwischen einfach- und doppelt-transgenen Tieren kein signifikanter Unterschied. Bei den Weibchen verlief die spontane EAE meist in einem schubförmig-remittierenden Verlauf, „RR-Maus“, bei den Männchen folgte sie überwiegend einem progredienten Verlauf.

MOG₁₋₁₂₅-immunisierte SJL/J-Wt-Weibchen, die als Referenz für ein klassisches Modell der induzierten EAE mitgeführt wurden, zeigten überwiegend einen schubförmig-remittierenden Verlauf mit partieller Remission.

Verlauf	Schubförmig-remittierend		Progredient
	Vollständige Remission	Partielle Remission	
TCR¹⁶⁴⁰			
TCR ¹⁶⁴⁰ (w)	71.4% (5/7)	14.3% (1/7)	14.3% (1/7)
TCR ¹⁶⁴⁰ (m)	35.3% (6/17)	11.7% (2/17)	53% (9/17)
TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}			
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (w)	43.7% (7/16)	25.0% (4/16)	31.2% (5/16)
TCR ¹⁶⁴⁰ x IgH ^{MOG} (m)	6.2% (1/16)	25.0% (4/16)	68.8% (11/16)
MOG₁₋₁₂₅ imm. SJL (w)	10.0% (1/10)	70.0% (7/10)	20.0% (2/10)

Tabelle 5.34:

Verteilung der Verlaufsvarianten der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren

In TCR¹⁶⁴⁰-Tieren verlief die EAE bei ca. 85% der spontan erkrankten Weibchen und 47% der Männchen in einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit überwiegend vollständiger Remission der Symptome zwischen dem ersten Auftreten der Erkrankung und dem ersten Rückfall. Die spontane EAE der übrigen Tiere zeigte einen progredienten Krankheitsverlauf. In TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren verlief die EAE bei 68,7% der Weibchen in einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit teils vollständiger, teils partieller Remission, bei den Männchen überwiegend in einem progredienten Verlauf bzw. einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit nur partieller Remission. Die EAE in MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Weibchen folgte überwiegend einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit partieller Remission. (w)= weiblich; (m)= männlich

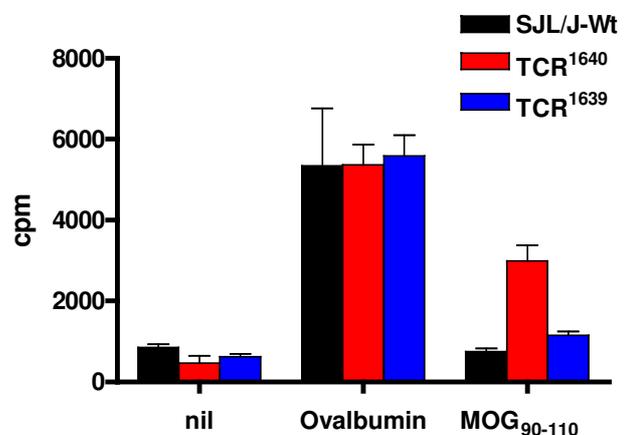
5.3.4 Studien zum „Epitope Spreading“: Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien aus TZR-C3-transgenen Mäusen

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer schubförmig-remittierenden Erkrankung, also einer erneuten Krankheitsphase nach einer symptomfreien Periode, könnte im sogenannten „Epitope Spreading“ liegen. Im Bereich der EAE versteht man unter „Epitope Spreading“ eine zweite bzw. dritte oder vierte Welle an neu gebildeten autoaggressiven T-Zellen, die spezifisch sind für ein anderes Epitop als das, welches die EAE ursprünglich hervorgerufen hat. Diese neu gebildeten T-Zellen könnten die Ursache für einen Krankheitsrückfall nach einer Remissionsphase sein.

Um festzustellen, inwiefern das Vorhandensein des transgenen T-Zell-Rezeptors in den verschiedenen Linien das endogene T-Zell-Repertoire der Tiere einschränkte, sollte versucht werden, in TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹- sowie in SJL/J-Wt-Mäusen T-Zelllinien gegen das immunologisch irrelevante Antigen Ovalbumin zu erzeugen. Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis aus einem Proliferationsassay mit den erzeugten Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien aus TZR-C3-transgenen Mäusen.

Abbildung 5.35:
Auch in TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Tieren können Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien erzeugt werden.

Zwei bis drei Monate alte Weibchen von SJL/J-Wt (n=2), TCR¹⁶⁴⁰ (n=4) und TCR¹⁶³⁹ (n=3) wurden mit Ovalbumin in CFA/P.tx. immunisiert. Am 10. Tag wurden aus den präparierten Lymphknoten Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien erzeugt. Dargestellt ist der Proliferationsassay zur 1. Restimulation der verschiedenen T-Zelllinien. Im Triplikat wurden dazu je 5x10⁴ T-Zellen der verschiedenen T-Zelllinien mit 2x10⁵ APCs (I-A^s) in Anwesenheit von Ovalbumin (100 µg/ml) und MOG₉₀₋₁₁₀ (100 µg/ml) inkubiert und ein Proliferationsassay durchgeführt. (cpm=counts per minute). Fehlerindikator=SEM



Es zeigte sich, dass auch in TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-transgenen Tieren Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien erzeugt und *in vitro* kultiviert werden konnten. Dabei bestand hinsichtlich der Reaktivität gegenüber Ovalbumin im Proliferationsassay kein Unterschied zwischen T-Zelllinien aus TZR-C3-transgenen und SJL/J-Wt-Tieren. Ihre Reaktivität gegenüber MOG verloren die Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien aus den TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Tieren allerdings z.T. im Verlauf ihrer Kultivierung mit Ovalbumin (Stimulationsindex von

MOG₉₀₋₁₁₀ sank von der 1. auf die 2. Restimulation für die TCR¹⁶⁴⁰-T-Zelllinien von 35.6 ± 8.3 auf 26.7 ± 14.8 bzw. für die TCR¹⁶³⁹-T-Zelllinien von 11.8 ± 3.6 auf 2.2 ± 0.7; Daten nicht gezeigt.)

Um zu überprüfen, welche TZR-Ketten die Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien der verschiedenen transgenen Mauslinien exprimierten, wurden die T-Zelllinien mit kommerziell verfügbaren Antikörpern gegen verschiedene V α - und V β -Ketten des TZR, TZR-Panel, angefärbt und mittels FACS analysiert (siehe Abb. 5.36 und 5.37). Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien aus SJL/J-Wt-Tieren überwiegend T-Zell-Rezeptoren verwenden, die aus der V α 2- und/oder V β 17-Kette zusammengesetzt sind (Daten nicht gezeigt). Auch in Ovalbumin-spezifischen Linien aus TCR¹⁶³⁹-Mäusen wurden T-Zell-Rezeptoren mit der V α 2-, V β 17- und zudem der V β 6-Kette verwendet. In den Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien aus TCR¹⁶⁴⁰-Tieren dominierten die transgenen Ketten, V α 8.3 und V β 4, aber auch in diesen Linien konnte die V α 2-Kette auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

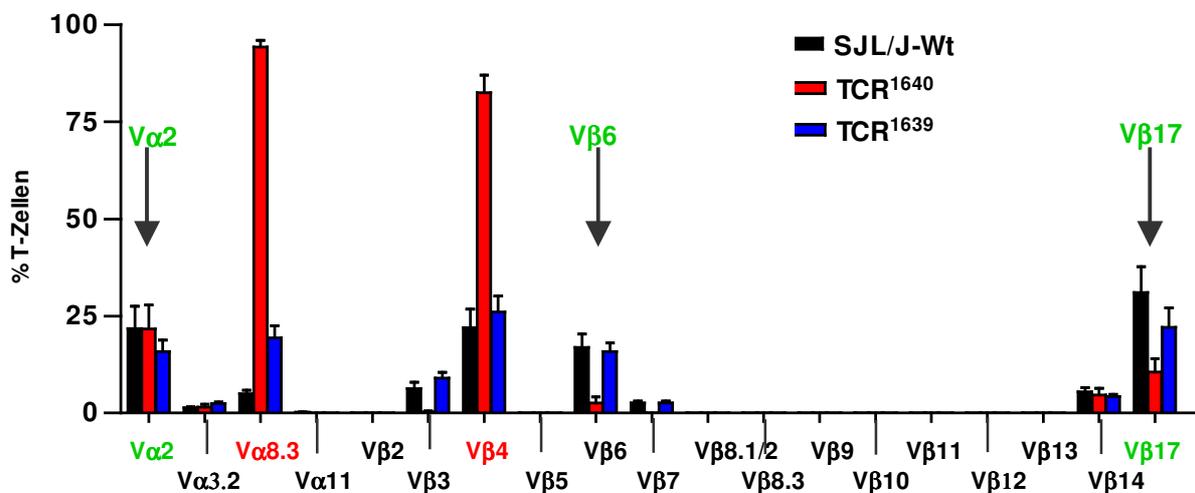


Abbildung 5.36:
Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien aus TZR-C3-transgenen Mäusen verwenden neben den transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten die V α 2- und z.T. die V β 6- und V β 17-Kette in ihren T-Zell-Rezeptoren.

In einer FACS-Färbung mit Antikörpern gegen verschiedene V α - und V β -variable Domänen des T-Zell-Rezeptor (TZR-Panel) wurden Zellen der Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien von SJL/J-Wt (n=2), TCR¹⁶⁴⁰ (n=4) und TCR¹⁶³⁹ (n=3) analysiert. Der Anteil der jeweiligen TZR-Kette ist als Prozentsatz zur Gesamtzahl der T-Zellen aufgetragen. Die transgenen TZR-Ketten V α 8.3 und V β 4 sind in Rot beschriftet.

Von Padovan et al. (1993) war bekannt, dass T-Zellen zwei unterschiedliche TZR- α -Ketten auf ihrer Zelloberfläche exprimieren können, was mit dem Fehlen einer allelen Exklusion bei der Rekombination der α -Ketten-Keimbahn gene zusammenhängt. Im Folgenden (Abb. 5.37) sind die einzelnen FACS-Färbungen aus der in Abbildung 5.36 beschriebenen Analyse für die

V α 8.3-, V β 4-, V α 2- und V β 17-Kette des TZR in je einer exemplarischen Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinie dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass in den T-Zelllinien aus TCR¹⁶³⁹-Tieren der prozentuale Anteil MOG-spezifischer, doppelt-positiver V α 8.3⁺/V β 4⁺-transgener T-Zellen während der Ovalbumin-spezifischen Selektion deutlich abnahm (von ca. 30% auf 4%).

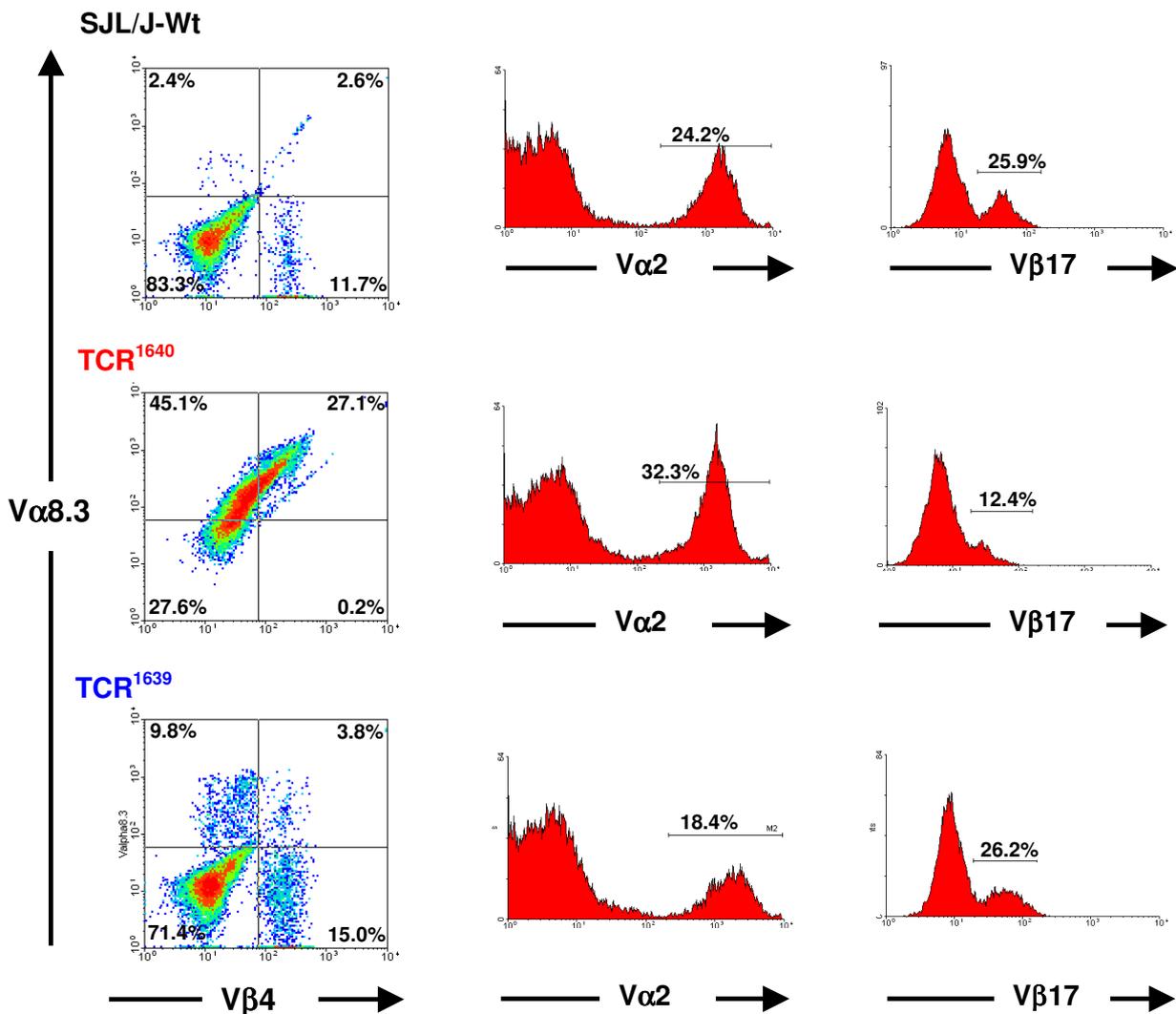


Abbildung 5.37:

Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien aus SJL/J-Wt-, TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Mäusen exprimieren neben den transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten die V α 2- und z.T. auch V β 17-Kette in ihren T-Zell-Rezeptoren.

In einer FACS-Analyse (Zweifachfärbung α -V α 8.3 und α -V β 4 bzw. Einfachfärbung α -V α 2 oder α -V β 17) wurden Zellen je einer Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien analysiert.

SJL/J-Wt: In dieser T-Zelllinie (#8153) koexprimieren 2.6% der Zellen die V α 8.3- und V β 4-Kette bzw. 24.2% der Zellen die V α 2- und 25.9% der Zellen die V β 17-Kette. **TCR¹⁶⁴⁰-Line:** Fast alle Zellen dieser T-Zelllinie (#8156) exprimieren den transgenen TZR bestehend aus V α 8.3 und V β 4, allerdings mit stark variablem Expressionsniveau. Auch in dieser T-Zelllinie exprimieren zusätzlich 32.3% der Zellen die V α 2-Kette. Die Expression der V β 17-Kette ist hier deutlich schwächer als in den SJL/J-Wt und TCR¹⁶³⁹-T-Zelllinien.

TCR¹⁶³⁹-Linie: Nur 3.8% der Zellen dieser T-Zelllinie (#8822) (in nicht-immunisierten TCR¹⁶³⁹-Tieren ca. 30%) koexprimieren die V α 8.3- und V β 4-Kette. Der Anteil V α 8.3- und V β 4-einfach-positiver Zellen (9.8% und 15%) ist höher als in nicht-immunisierten Tieren (4.4% und 8.4%). 18.4% der Zellen exprimieren die V α 2- und 26.2% die V β 17-Kette. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der T-Zellen im jeweiligen Quadranten bzw. markierten Bereich.

Erstaunlicherweise exprimierten in den Ovalbumin-spezifischen T-Zelllinien aus TCR¹⁶⁴⁰-Tieren noch immer die meisten T-Zellen die transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten, allerdings zu einem geringeren Expressionsniveau. Außerdem konnte zusätzlich die V α 2-Kette auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, jedoch nur geringfügig die V β 17-Kette. Weitere FACS-Färbungen, in denen versucht werden soll, die transgene V β 4- und zugleich die V β 17-Kette nachzuweisen, könnten darüber Aufschluss geben, ob auf einer T-Zelle auch zwei β -Ketten koexprimiert werden können.

Da auch in den TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien erzeugt werden konnten, ist es theoretisch möglich, trotz der Anwesenheit eines transgenen TZR's T-Zell-Immunantworten gegenüber anderen (Myelin-)Antigenen zu induzieren. Insofern besteht in diesen Tieren grundsätzlich die Möglichkeit des „Epitope Spreading“, was wiederum eine Erklärung für den schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf der spontanen EAE in diesen Tieren sein könnte.

5.3.5 ZNS-Läsionen von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren ähneln denen von Multiple-Sklerose-Patienten

Das ZNS von TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren mit spontaner EAE wurde histologisch analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl im Rückenmark und optischen Nerv als auch im Gehirn der erkrankten Tiere pathologische Läsionen zu finden waren. Dies stand im starken Kontrast zu den von Krishnamoorthy et al. (2006) beschriebenen Devic-Tieren, TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-C57BL/6, in denen pathologische Läsionen ausschließlich im Rückenmark und optischen Nerv auftraten (sog. Neuromyelitis Optica; Devic Phänotyp).

Die histologische Analyse der spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Mäuse zeigte, dass es für die verschiedenen klinischen Varianten der spontanen EAE, Ataxie oder Paralyse, jeweils ein passendes histologisches Gegenstück gab. In Mäusen mit Ataxie waren zelluläre Infiltrate überwiegend im Cerebellum und der Medulla oblongata zu finden, wohingegen in Tieren mit klassischer, paralytischer EAE die pathologischen Läsionen vor allem im Rückenmark auftraten. Es stellte sich heraus, dass auch hinsichtlich des histologischen Erkrankungsmaßes (Infiltrate/mm²) sowie der Lokalisation der Läsionen kein Unterschied zwischen kranken TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren bestand (siehe Tab. 5.38).

	Spontane EAE	Rückenmark		Optischer Nerv		Gehirn	
		Inf.	DM	Inf.	DM	Inf.	DM
TCR¹⁶⁴⁰							
#8222 (w)	RR kompl. Remission Paralyse & Ataxie	2.4	konf. Plaques	einzelne TZ	0	Men., Medulla, Mesenz., Periventr. Cerebellum	extrem Cerebellum; Medulla, Periventr.
#8287 (m)	Progr. mit Paralyse & Ataxie	3.9	konf. Plaques	diffuse TZ	PV	Medulla, Mesenz., Cerebellum Men.,	Medulla
#8290 (w)	Progr. mit Paralyse & Ataxie	2.8	konf. Plaques	n.a	n.a	Medulla	Periventr., Medulla
TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}							
#8502 (m)	Progr. mit Paralyse	2.9	konf. Plaques	diffuse TZ	PV	Men., Medulla	
#8575 (w)	Progr. mit Paralyse	2.5	konf. Plaques	diffuse TZ	PV	Men., Medulla	P.V., Medulla
#8589 (w)	RR mit partiel. Remission, Paralyse	3.3	konf. Plaques	diffuse TZ	0	Medulla	

Tabelle 5.38:

Auswertung der histologischen Analyse spontan erkrankter TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tiere (Prof. H. Lassmann)

Rückenmark, optischer Nerv und Gehirn der spontan erkrankten Tiere wurden histologisch bzgl. Infiltration (Inf.) und Ausmaß der Demyelinisierung (DM) untersucht. Das Ausmaß der Infiltration von Zellen ins Rückenmark ist als durchschnittliche Anzahl der entzündlichen Infiltrate/Rückenmarksquerschnitt angegeben. Die Demyelinisierung trat in konfluent demyelinisierten Plaques auf (= konf. Plaques, was auf der Skala von Storch et al. (1998) dem 2. Grad entspricht); Men= Meninges; Mesenz.= Mesenzephalon; Periventr.= Periventrilular; PV= perivaskular, n.a.= nicht analysiert; einzelne oder diffuse TZ= T-Zell-Infiltration; RR= Relapsing-Remitting (engl.: schubförmig-remittierend); die Tiere wurden mit akuter paralytischer EAE (EAE-Grad von 3-4) und/oder Ataxie getötet. (w)= weiblich; (m)= männlich

Die mögliche Beteiligung von Gehirn, Rückenmark und optischem Nerv zum einen sowie die stark variable Lokalisation der Läsionen innerhalb der betroffenen Organe zum anderen ist dem histologischen Bild der Multiplen Sklerose in unseren Breiten sehr ähnlich.

Im Folgenden sind histologische Färbungen des Rückenmarks (siehe Abb. 5.39), des Cerebellums und der Medulla oblongata (siehe Abb. 5.40) eines TCR¹⁶⁴⁰-Tieres (# 8222) mit spontaner schubförmig-remittierender EAE dargestellt. Zum Zeitpunkt der Präparation für die mikroskopische Untersuchung hatte das Tier einen ersten Krankheitsrückfall mit sehr stark ausgeprägter Paralyse und Ataxie.

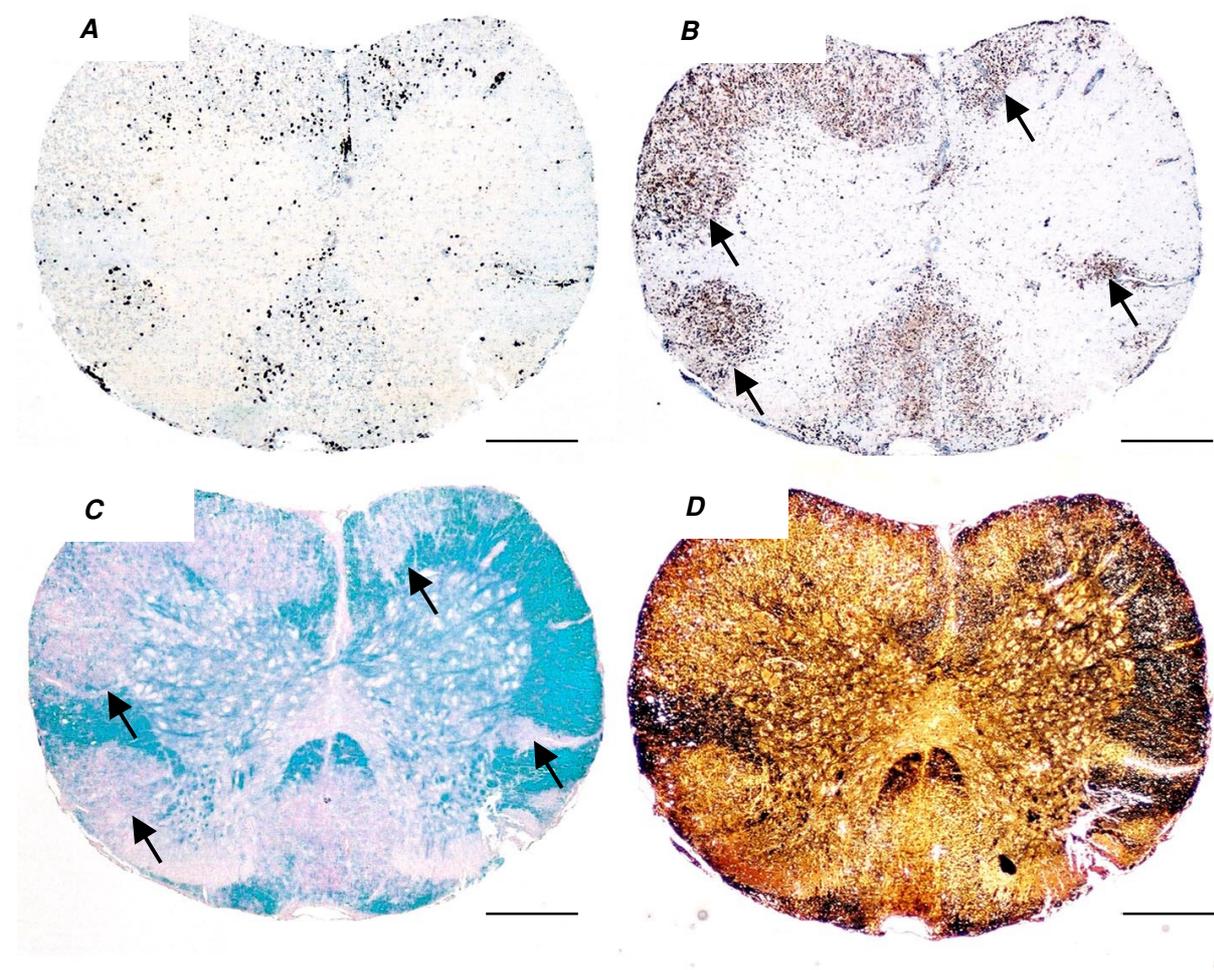


Abbildung 5.39:
Histologische Untersuchung des Rückenmarks einer spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Maus mit klassischer Paralyse und Ataxie (# 8222) (Prof. H. Lassmann)
 Das Rückenmark eines PFA-perfundierten TCR¹⁶⁴⁰-Tieres wurde mittels Immunhistochemie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD3 (A) bzw. gegen Mac-3 (B) angefärbt. Mac-3⁺-Makrophagen stellten die dominierende Zellpopulation in den Rückenmarks-Infiltraten dar. In (C) ist eine Färbung mit Luxol Fast Blue dargestellt. Nur intaktes Myelin wird blau angefärbt, insofern gibt der Verlust der Blaufärbung Aufschluss über das Ausmaß der Demyelinisierung. Die Demyelinisierung war sehr stark vorangeschritten und in etwa deckungsgleich mit den infiltrierenden Zellen (schwarze Pfeile). Zum Nachweis axonaler Schäden wurde das Cerebellum in (D) mit Bielschowsky Silber Imprägnierlösung angefärbt. Unbeschädigte Axone erhalten mit dieser Färbung einen braunen Farbton, beschädigte Axone werden nicht angefärbt und sind wie der Hintergrund gelb-braun gefärbt. Der Größenmaßstab entspricht in (A) – (D) 200 µm.

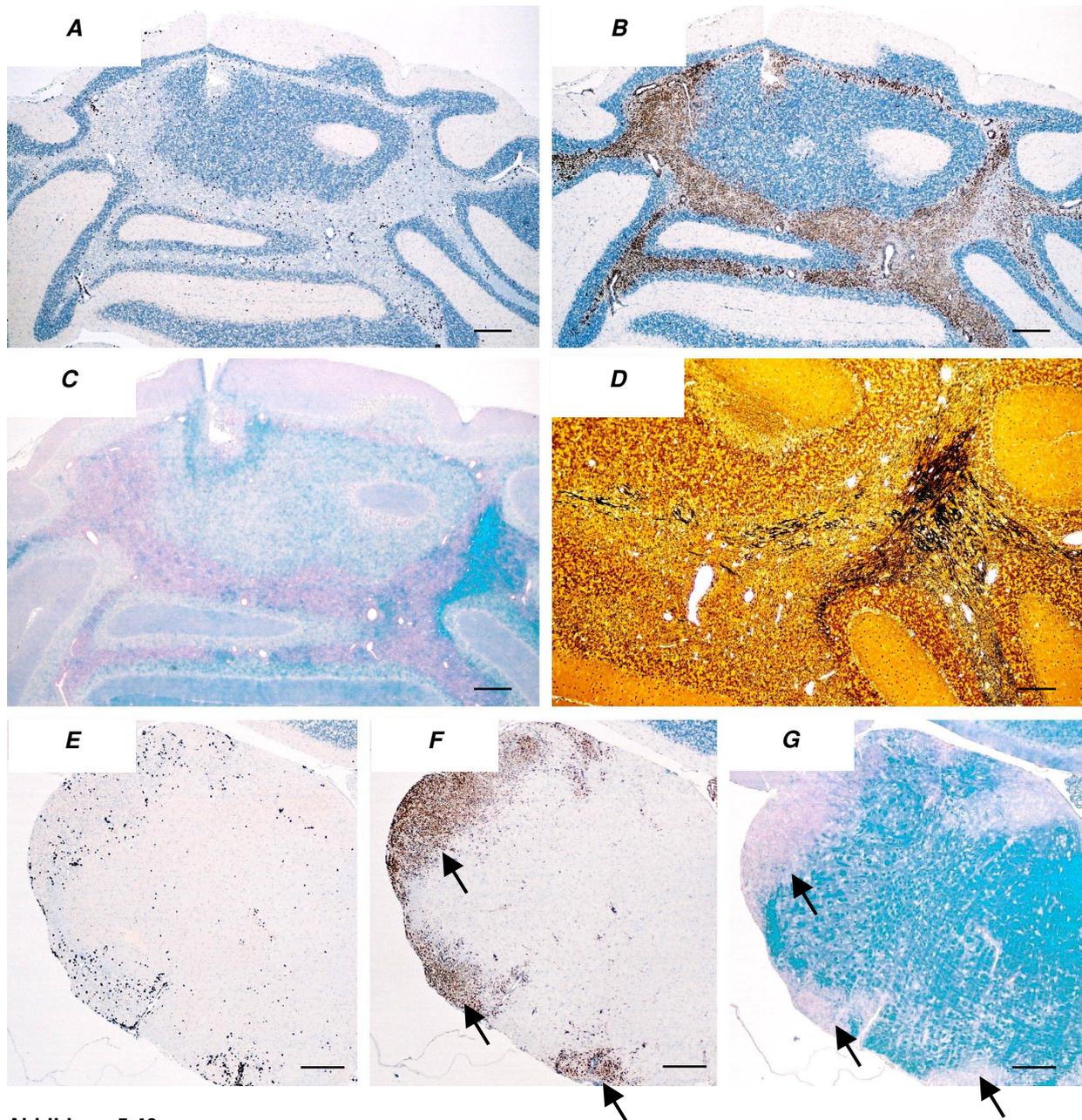


Abbildung 5.40:

Histologische Untersuchung des Cerebellums und der Medulla oblongata einer spontan erkrankten TCR^{1640} -Maus mit Ataxie (# 8222) (Prof. H. Lassmann)

Das Cerebellum (A) - (D) bzw. die Medulla oblongata eines PFA-perfundierten TCR^{1640} -Tieres (E) - (G) wurde mittels Immunhistochemie unter Verwendung von Antikörpern gegen CD3 (A) und (E) bzw. gegen Mac-3 (B) und (F) angefärbt. Mac-3⁺-Makrophagen stellten die dominierende Zellpopulation in den Infiltraten ins Cerebellum und Medulla oblongata dar. In (C) und (G) sind Färbungen mit Luxol Fast Blue dargestellt. Nur intaktes Myelin wird blau angefärbt, insofern gibt der Verlust der Blaufärbung Aufschluss über das Ausmaß der Demyelinisierung. Sowohl im Cerebellum als auch in der Medulla oblongata war die Demyelinisierung sehr stark vorangeschritten und in etwa deckungsgleich mit den infiltrierenden Zellen (schwarze Pfeile). Zum Nachweis axonaler Schäden wurde das Cerebellum in (D) mit Bielschowsky Silber Imprägnierlösung angefärbt. Unbeschädigte Axone erhalten mit dieser Färbung einen braunen Farbton, beschädigte Axone werden nicht angefärbt und sind wie der Hintergrund gelb-braun gefärbt. Der Größenmaßstab entspricht in (A) – (G) 200 μ m.

Entsprechend den paralytischen und ataxischen Krankheits-Symptomen zeigte die histologische Untersuchung eine starke zelluläre Infiltration ins Cerebellum, in die Medulla oblongata und ins Rückenmark sowie eine voranschreitende Demyelinisierung und

Beschädigung der Axone in diesen Organen. Unter den infiltrierenden Zellen befanden sich überwiegend Mac-3⁺-Makrophagen und CD3⁺-T-Zellen.

Die histologische Untersuchung von spontan erkrankten Tieren in einem späten, chronischen Krankheitsstadium (ca. zwei Monate nach Beginn der spontanen EAE) zeigte, dass die „Erkrankung langsam auszubrennen scheint, da kaum noch rezente Entmarkungsaktivität zu finden war“ (Zitat Prof. H. Lassmann) und dass in den betroffenen Organen Remyelination stattfindet (siehe Abb. 5.41).

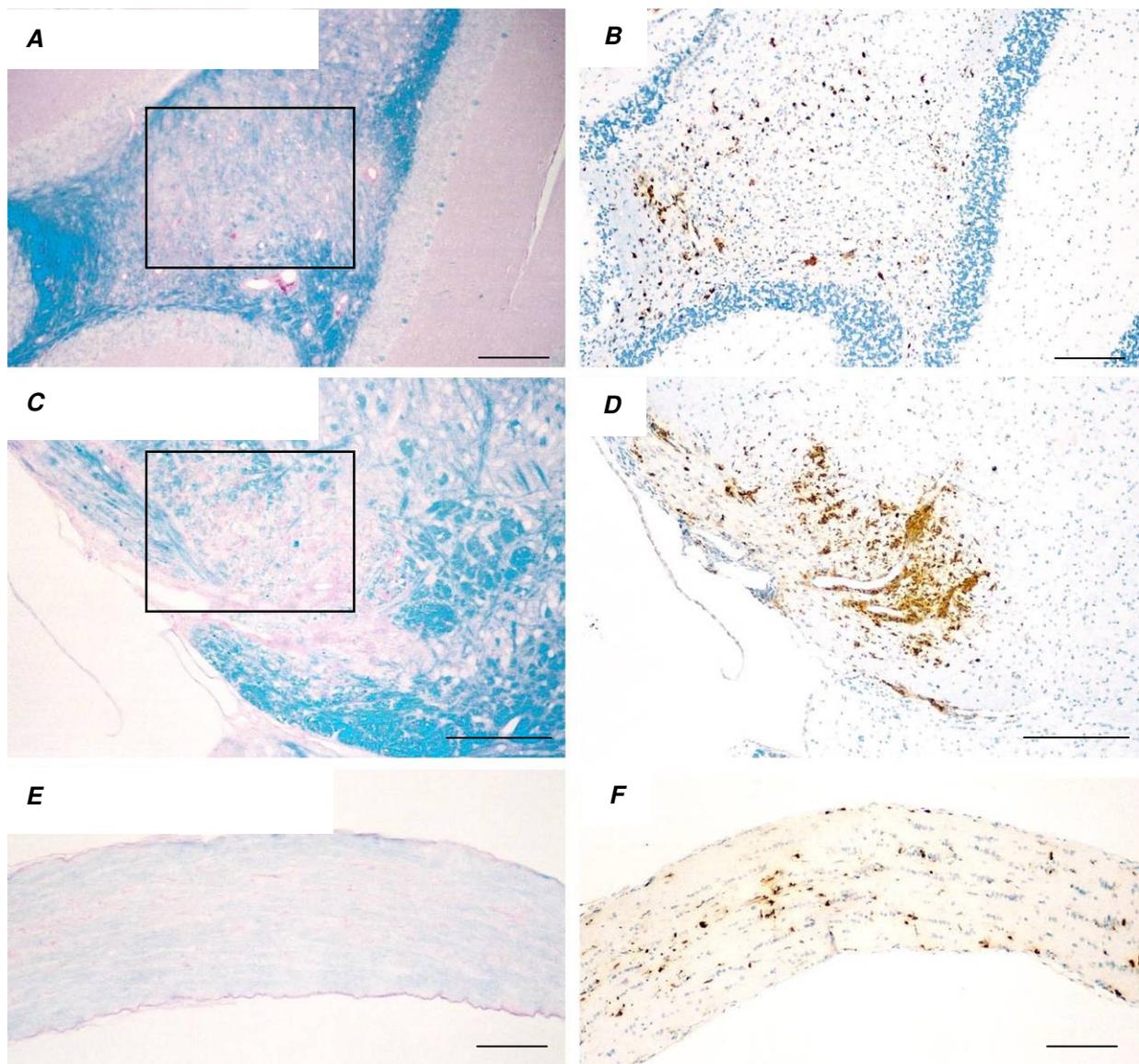


Abbildung 5.41:

Histologische Untersuchung des Cerebellums, der Medulla oblongata und des optischen Nervs einer chronisch kranken TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Maus mit Ataxie und Paralyse (# 1378) (Prof. H. Lassmann)

Das Cerebellum (A und B), die Medulla oblongata (C und D) und der optische Nerv (E und F) wurden in der linken Spalte mit Luxol Fast Blue angefärbt. Remyelination zeigt sich durch eine zarte Blaufärbung innerhalb eines demyelinisierten Bereichs (sogenannte „shadow plaques“; siehe schwarzes Rechteck). In der rechten Spalte sind mit Immunhistochemie unter Verwendung von α-Mac-3-Antikörpern Mac-3⁺-Makrophagen in den Infiltraten dargestellt. Die Anzahl infiltrierender Zellen nimmt in chronisch kranken Tieren deutlich ab. Der Größenmaßstab entspricht in (A) – (F) 200 µm.

5.3.6 ZNS-Infiltrate bestehen aus M ϕ T-Zellen und B-Zellen

Um die genaue Zusammensetzung der ins ZNS infiltrierte Zellen zu bestimmen, wurden das Rückenmark und Gehirn von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren präpariert. Die darin enthaltenen Lymphozyten konnten mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und einer FACS-Analyse unterzogen werden (siehe Abb. 5.42).

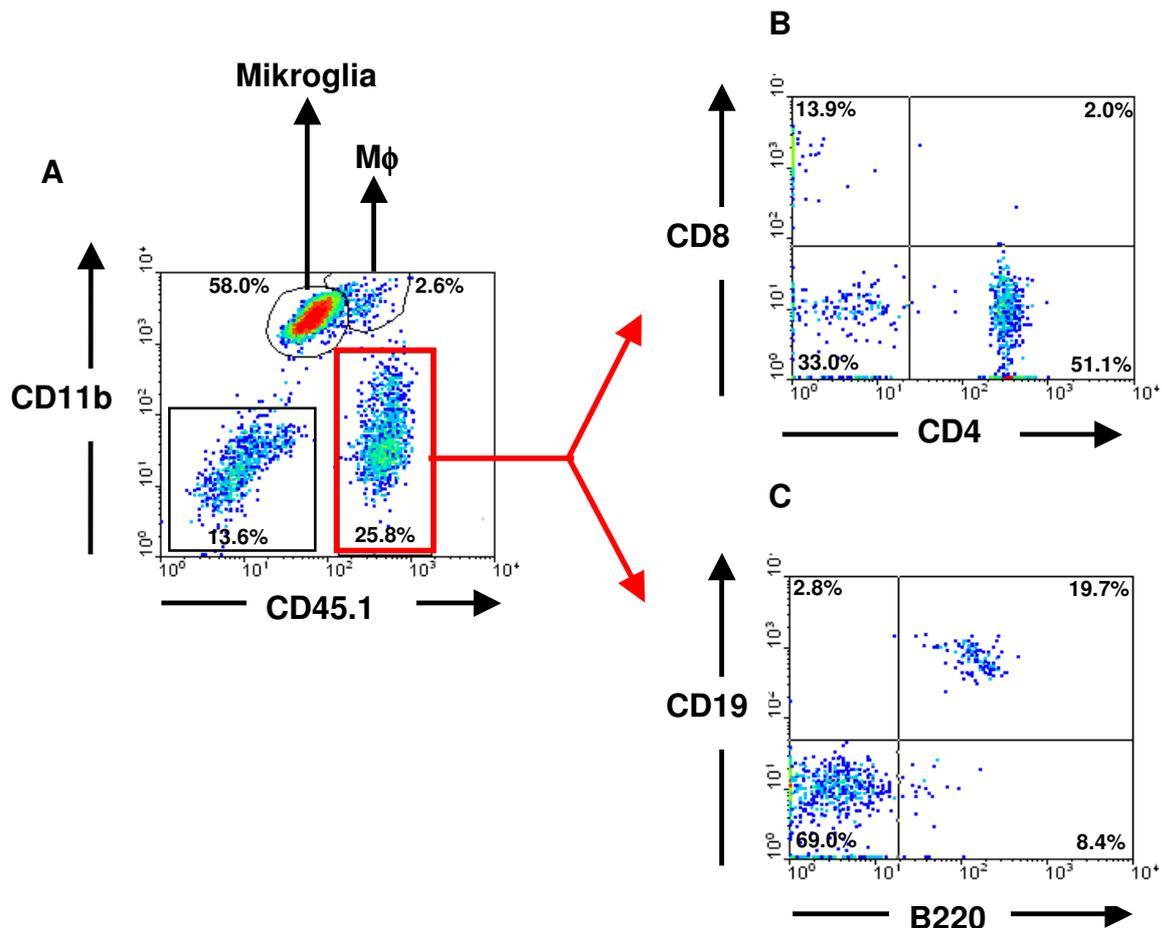


Abbildung 5.42:
Die ins ZNS von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren mit spontaner EAE infiltrierte Zellpopulation besteht aus T-Zellen, B-Zellen und M ϕ .

Die ins ZNS von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren infiltrierte Lymphozyten konnten mit Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und mittels FACS analysiert werden.

(A) Analyse einer FACS-Färbung mit folgenden Antikörpern: α -CD45.1-FITC, α -CD11b-PE, α -CD4-PerCP und α -CD8-APC (B) Analyse einer FACS-Färbung mit folgenden Antikörpern: α -CD45.1-FITC, α -CD11b-PE, α -B220-PerCP und α -CD19-APC. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten bzw. in der jeweiligen Region.

In der FACS-Färbung mit Antikörpern gegen CD45.1 (Marker für alle hämatopoetischen Zellen) und CD11b(α^M -Untereinheit des Integrins CR3) konnten innerhalb der isolierten Lymphozyten vier Zellpopulationen unterschieden werden (Abb. 5.42A): CD45.1^{hoch}CD11b⁺-Makrophagen (M ϕ), CD45.1^{niedrig}CD11b⁺-Mikroglia und CD45.1⁺CD11b⁻-Lymphozyten sowie CD45⁻CD11b⁻-nicht-lymphatische Zellen.

Die Analyse der Vierfachfärbung (α -CD45.1, α -CD11b, α -CD4 und α -CD8) zeigte, dass in der $CD45^+CD11b^-$ -Lymphozytenpopulation vor allem $CD4^+$ -T-Zellen und eine geringe Anzahl $CD8^+$ -T-Zellen vorhanden waren (Abb. 5.42 B). Des Weiteren konnte nach einer Vierfachfärbung (α -CD45.1-, α -CD11b-, α -B220- und α -CD19) auch $B220^+CD19^+$ -B-Zellen innerhalb der $CD45^+CD11b^-$ -Population identifiziert werden (Abb. 5.42 C).

5.3.7 ZNS-infiltrierende T-Zellen sind stark aktiviert

Um den Aktivierungsstatus der ins ZNS infiltrierten T-Zellen zu überprüfen, wurde erneut eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden zum einen Antikörper gegen CD4, CD3, CD25 und CD62L (L-Selektin, ein Marker für naive T-Zellen), zum anderen gegen die $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Kette des transgenen T-Zell-Rezeptors verwendet (siehe Abb. 5.43).

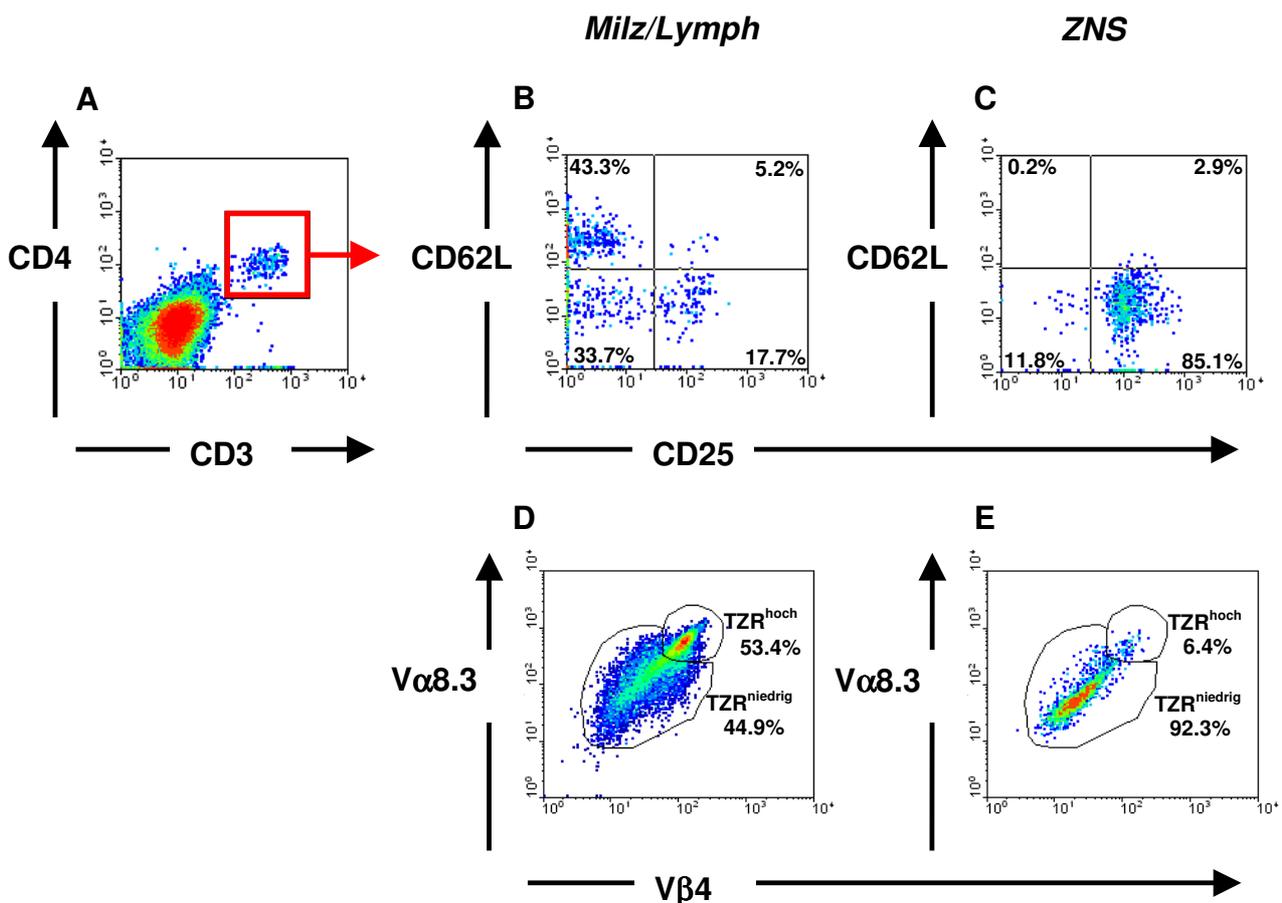


Abbildung 5.43:

ZNS-infiltrierende $CD4^+$ -T-Zellen von spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren sind stark aktiviert.

Die ins ZNS von spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren infiltrierten Lymphozyten konnten mit Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen und mittels FACS analysiert werden. (A - C) Analyse einer FACS-Färbung mit folgenden Antikörpern: α -CD4-PerCP, α -CD3-FITC, α -CD62L-APC und α -CD25-PE. (A) Es wurde auf $CD4^+CD3^+$ -T-Zellen „gated“ (roter Quadrant), dargestellt im ZNS. (D, E) Analyse einer FACS-Färbung mit folgenden Antikörpern: α -CD4-PerCP, α -CD3-FITC, α - $V\alpha 8.3$ -PE und α - $V\beta 4$ -FITC. (B & D) Milz/Lymphknoten; (C & E) ZNS-isolierte Lymphozyten. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten bzw. in der jeweiligen Region.

Es war bekannt, dass aktivierte T-Zellen kein CD62L auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, dafür aber verstärkt CD25 (IL-2R α -Kette). Entsprechend zeigte sich, dass im Vergleich zu CD4⁺-T-Zellen aus der Peripherie (siehe Abb. 5.43 B) die ins ZNS eingewanderten CD4⁺-T-Zellen (siehe Abb. 5.43 C) desselben Tieres stark aktiviert waren, und kein CD62L mehr auf ihrer Oberfläche exprimierten, dafür nun aber CD25. Außerdem stellte sich heraus, dass es im ZNS zu einer Herunterregulierung des transgenen T-Zell-Rezeptors auf CD4⁺CD3⁺-T-Zellen kam, da ZNS-infiltrierende CD4⁺-T-Zellen (siehe Abb. 5.43 E) zu einem größeren Prozentsatz aus der TZR^{niedrig}-Population bestanden, als CD4⁺-T-Zellen der peripheren Lymphknoten (siehe Abb. 5.43 D).

5.3.8 An der spontanen EAE von TCR^{1640} -Tieren sind T_{H1} - und T_{H17} -Zellen beteiligt

Aktivierte T-Zellen können je nach Zusammensetzung des sie umgebenden Zytokinmilieus in T_{H1} -, T_{H2} - oder T_{H17} -Effektorzellen differenzieren. EAE galt bis vor kurzen als eine klassische T_{H1} -Immunerkrankung und dem Zytokin $IFN\gamma$ wurde diesbezüglich eine entscheidende Rolle im Entzündungsprozess zugeschrieben. Neuere Studien, unter anderem mit $IFN\gamma$ - und IL-17-Knock-out-Mäusen legen allerdings nahe, dass auch T_{H17} -Zellen, die das Zytokin IL-17 produzieren, eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Autoimmunität spielen (Komiyama et al., 2006; Ferber et al., 1996).

Um zu untersuchen, ob in spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren die T_{H1} - oder T_{H17} -Effektorzellpopulation von Bedeutung ist, wurden Milz, Lymphozyten und ZNS-infiltrierende Zellen in einer intrazellulären Zytokinfärbung auf Anwesenheit von $IFN\gamma$ und IL-17 analysiert (siehe Abb. 5.44 und 45). Es zeigte sich, dass unter den $CD4^+$ -T-Zellen von Milz und Lymphknoten sowie innerhalb der ZNS-infiltrierten Zellen von TCR^{1640} -Tieren sowohl $IFN\gamma$ - als auch IL-17-produzierende T_{H1} - und T_{H17} -T-Zellen vertreten waren und zwar sowohl in gesunden als auch in spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren. In SJL/J-Wt-Tieren konnten in der Milz hingegen überwiegend $IFN\gamma$ -produzierende Zellen detektiert werden.

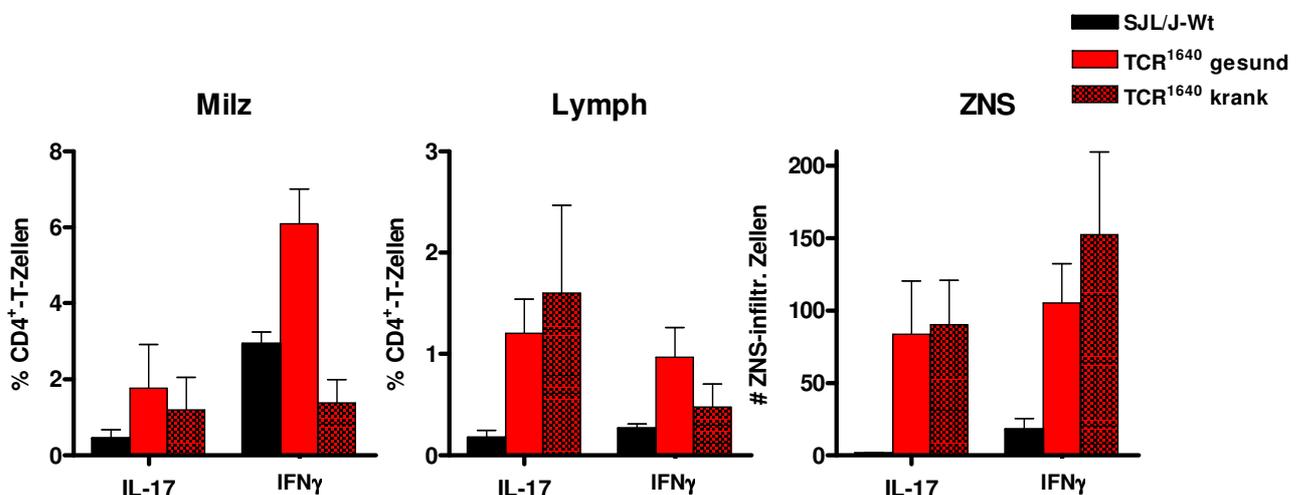


Abbildung 5.44:

Auswertung der intrazellulären Zytokin-Färbung von $IFN\gamma$ - und IL-17-produzierenden $CD4^+$ -Zellen aus der Milz, Lymphknoten und dem ZNS von TCR^{1640} -Tieren

Milzzellen, Zellen aus den Lymphknoten und über Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene ZNS-infiltrierende Zellen wurden in einer intrazellulären Zytokin-Färbung mit α - $IFN\gamma$ - und α -IL-17-Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der Prozentsatz IL-17- und $IFN\gamma$ -positiver $CD4^+$ -T-Zellen in der analysierten Zellpopulation von Milz und Lymphozyten bzw. die absolute Anzahl ZNS-infiltrierender IL-17- und $IFN\gamma$ -positiver $CD4^+$ -T-Zellen. SJL/J-Wt (n=4); TCR^{1640} gesund (n=3); TCR^{1640} spon. EAE (n=4)

Nachfolgende Abbildung zeigt eine intrazelluläre Zytokinfärbung für IFN γ und IL-17 in Milz, Lymphozyten und ZNS-infiltrierenden Lymphozyten eines SJL/J-Wt-Tiers im Vergleich zu einem gesunden und einem kranken TCR¹⁶⁴⁰-Tier.

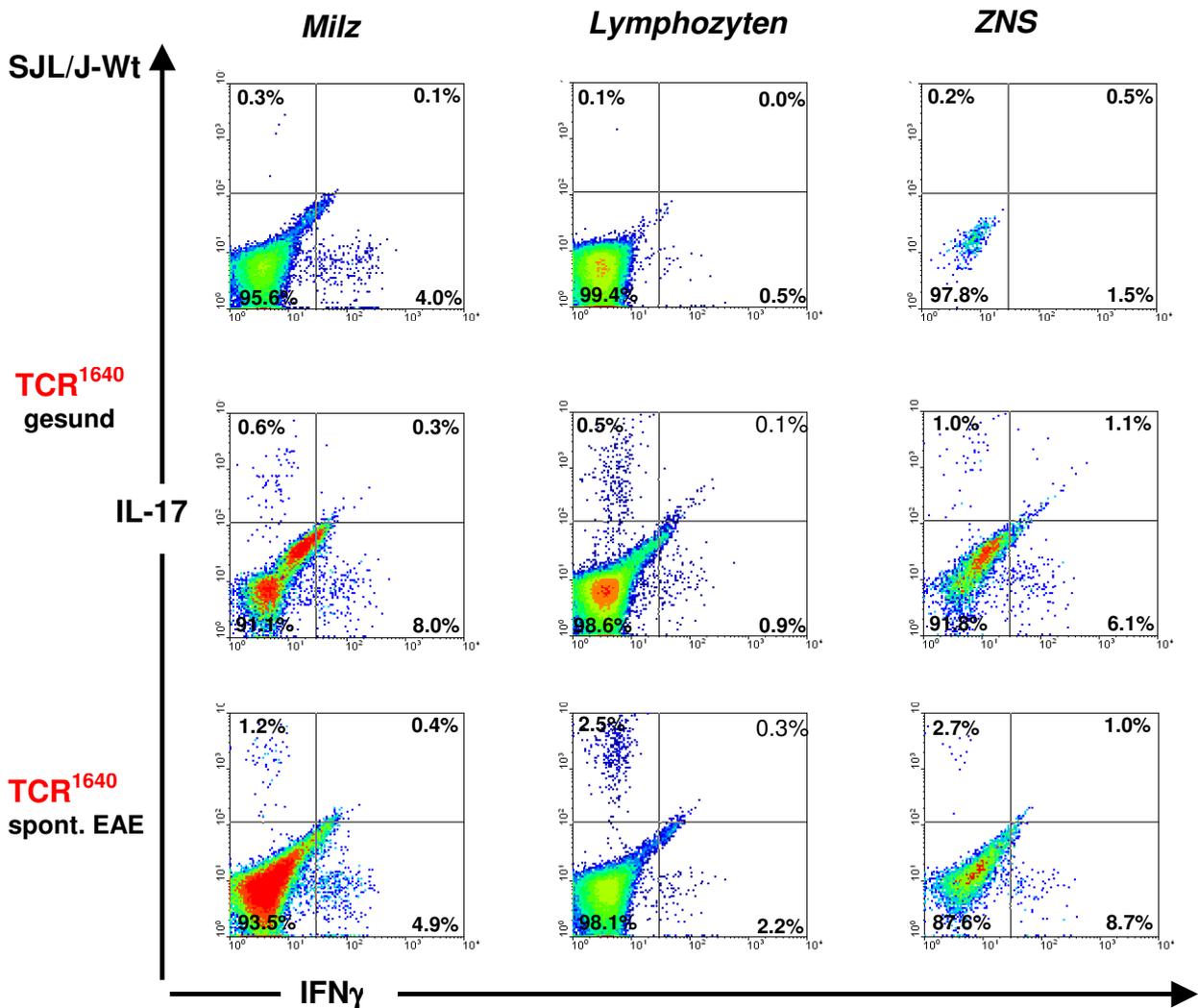


Abbildung 5.45: Intrazelluläre Zytokin-Färbung von IFN γ - und IL-17-produzierenden CD4⁺-T-Zellen aus der Milz, Lymphknoten und dem ZNS eines SJL/J-Wt-Tieres und eines gesunden sowie spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieres

Milzzellen, Zellen aus den Lymphknoten und über Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene ZNS-infiltrierende Zellen wurden in einer intrazellulären Zytokin-Färbung mit α -IFN γ - und α -IL-17-Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Es wurde auf CD4⁺-T-Zellen gated. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten.

Es zeigte sich, dass unter den CD4⁺-T-Zellen von Milz und Lymphknoten sowie innerhalb der ZNS-infiltrierten Zellen von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren sowohl IFN γ - als auch IL-17-produzierende T_H1- und T_H17-T-Zellen vertreten waren und zwar sowohl in gesunden als auch in spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren. In SJL/J-Wt-Tieren konnten in der Milz hingegen überwiegend IFN γ -produzierende Zellen detektiert werden.

5.3.9 Subklinische Infiltrate und Demyelinisierung in gesunden TCR^{1640} -Tieren

Interessanterweise war es möglich, auch aus gesunden TCR^{1640} -Tieren ZNS-infiltrierende Lymphozyten zu gewinnen, unter denen sich ebenso $IFN\gamma$ - und $IL-17$ -produzierende $CD4^+$ -T-Zellen befanden. Spontane EAE trat in den analysierten TCR^{1640} -Tieren durchschnittlich mit 15 Wochen auf, wobei zwischen den einzelnen Tieren große Schwankungen vorlagen. Um zu überprüfen, ob nicht bereits in „äußerlich gesunden“ Tieren sogenannte subklinische Entzündungsprozesse auftraten, wurden drei Monate alte, gesunde TCR^{1640} -Tiere histologisch untersucht (siehe Abb. 5.46).

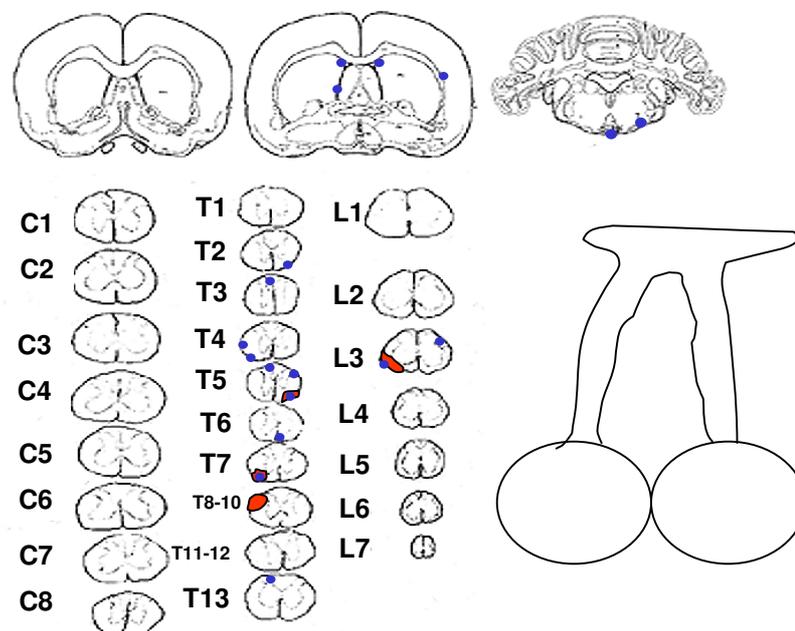


Abbildung 5.46:

Bereits in gesunden, drei Monate alten TCR^{1640} -Tieren ist histologisch eine Entzündung und Demyelinisierung nachweisbar. (Prof. H. Lassmann)

Immunhistologische Analyse eines PFA-perfundierten gesunden, drei Monate alten TCR^{1640} -Tieres (#8469) in verschiedenen Rückenmark-Segmenten [cervical (C1-C8); thoracal (T1-T13) und lumbal (L1-L7)] des Gehirns und der optischen Nerven. Blau markierte Bereiche, an denen Zellinfiltrate gefunden werden: Meningen, laterale Ventrikel und Lemniscus lateralis („seitliche Schleifenbahn“), Temporallappen und lumbale Segmente des Rückenmarks. Demyelinisierung (rot markierte Bereiche) entlang lumbaler Segmente des Rückenmarks.

Wie die immunhistologische Untersuchung zeigte, waren bereits in noch symptomfreien Tieren „Entzündung und geringgradige Entmarkung zu finden, so dass die nicht erkrankten Tiere im wesentlichen eine ähnliche Pathologie im ZNS entwickeln wie die erkrankten Tiere, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß“ (persönliche Mitteilung von Prof. H. Lassmann).

5.3.10 Analyse des Zytokinprofils im ZNS mit Real-time-PCR

Zytokine und Chemokine, die von ZNS-infiltrierenden Zellen gebildet werden, tragen zum Entzündungsprozess bei und schaffen ein definiertes entzündliches Milieu. Mit quantitativer Real-time-PCR konnte das Expressionsmuster einiger Zytokine im ZNS von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren im Vergleich zu MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Tieren untersucht werden. Zusätzlich wurden doppelt-transgene TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tiere, die sich in einer chronischen Krankheitsphase befanden, analysiert (siehe Abb. 5.47).

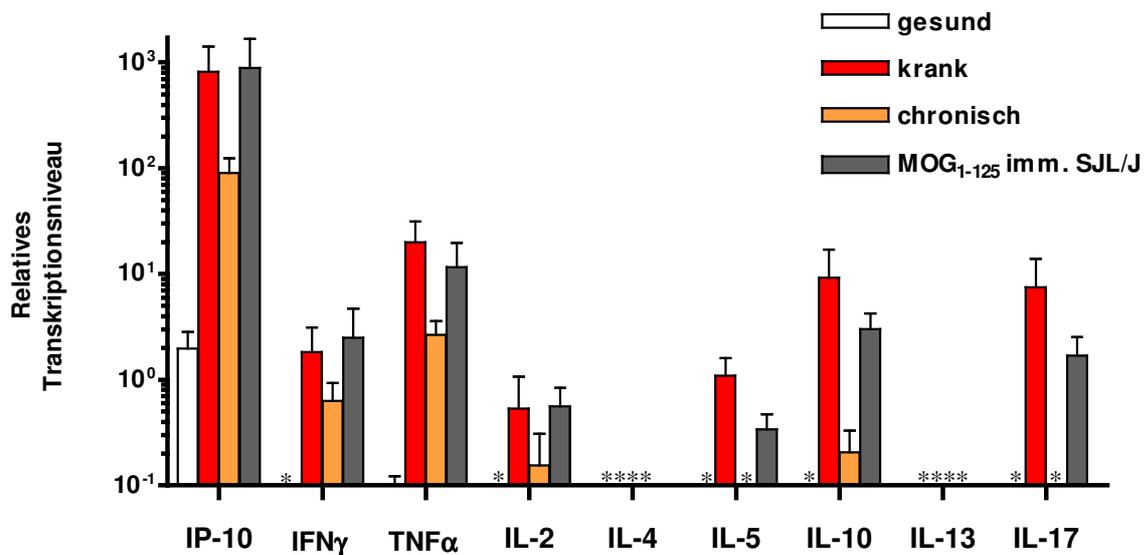


Abbildung 5.47:

Quantitative Real-time-PCR-Analyse der Expression verschiedener Zytokine im Rückenmark von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren

Gesunden, akut erkrankten und chronisch kranken Tieren wurde das Rückenmark entnommen, homogenisiert, Gesamt-RNA gewonnen und die cDNA davon synthetisiert. Mit quantitativer Real-time-PCR wurde die Expression von IP-10, IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 und GAPDH untersucht. Angegeben ist die Expressionsstärke der einzelnen Zytokine relativ zu GAPDH, multipliziert mit 10.000. Jeder Assay wurde im Tripikat durchgeführt. Der Fehlerindikator bezieht sich auf den SEM. * = nicht detektierbare Expression; TCR¹⁶⁴⁰ gesund (n=3; weiß), TCR¹⁶⁴⁰-Tiere mit akuter EAE (EAE-Grad =4; n=3; rot), TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} mit chronischer EAE (EAE-Grad =2-3 für mind. 1 Woche; n=4; orange) und MOG₁₋₁₂₅-immunisierte SJL/J-Tiere mit akuter EAE (EAE-Grad >3; n=4; grau)

Es stellte sich heraus, dass im ZNS von spontan kranken TCR¹⁶⁴⁰-Tieren und mit MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Tieren das gleiche Expressionsmuster an Zytokinen zu finden war. In beiden Gruppen konnte im ZNS die mRNA von IP-10, IFN γ , TNF α , IL-2, IL-5, IL-10 und IL-17 detektiert werden. In chronisch kranken Tieren war die Expression der einzelnen Zytokine deutlich schwächer als in akut kranken Tieren und einzelne Zytokine, wie IL-5 und IL-17, konnten nicht detektiert werden. Die T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13, waren zu keiner Zeit detektierbar, aber IL-5 und IL-10. Im ZNS von gesunden TCR¹⁶⁴⁰-Tieren konnte mit Ausnahme von IP-10 keine Zytokinexpression detektiert werden.

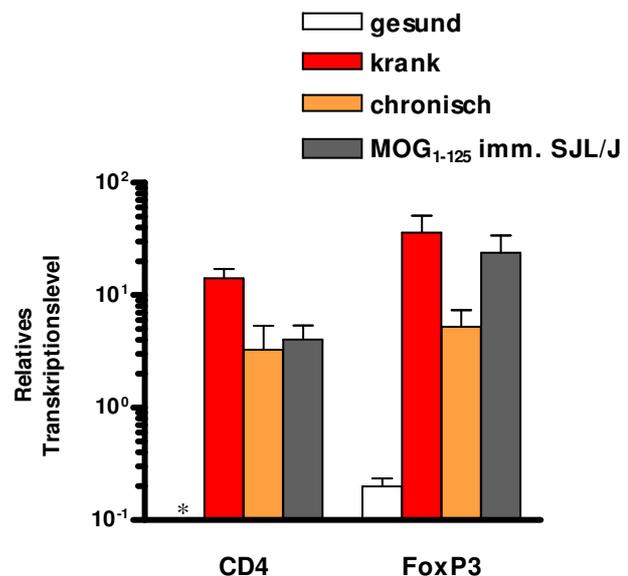
3.5.11 CD25⁺FoxP3⁺-T_{Reg}-Zellen in TZR-C3-transgenen Tieren

Potentiell autoaggressive T- und B-Zellen sind ein normaler Bestandteil des Immunrepertoires aller Individuen und werden durch verschiedene Toleranzmechanismen in Schach gehalten. CD25⁺-regulatorische T-Zellen, T_{Regs}, die den Transkriptionsfaktor FoxP3 exprimieren, leisten einen wesentlichen Beitrag für die Aufrechterhaltung der Toleranz, und ein Fehlen bzw. ein Defekt in dieser T-Zellpopulation fördert das Auftreten von Autoimmunität (zusammengefasst in Shevach, 2000).

Mit Hilfe von Real-time-PCR konnte das mRNA-Expressionsniveau von CD4 und FoxP3 im ZNS von akut sowie chronisch kranken TCR¹⁶⁴⁰-Tieren im Vergleich zu kranken MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Tieren analysiert werden (siehe Abb. 5.48).

Abbildung 5.48:
Quantitative Real-time-PCR-Analyse der Expression von CD4 und FoxP3 im Rückenmark von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren

Gesunden, akut erkrankten und chronisch kranken Tieren wurde das Rückenmark entnommen, homogenisiert, Gesamt-RNA gewonnen und die cDNA davon synthetisiert. Mit quantitative Real-time-PCR wurde die Expression von CD4, FoxP3 und GAPDH untersucht. Angegeben ist die Expressionsstärke von CD4 und FoxP3 relativ zu GAPDH multipliziert mit 10.000. Jeder Assay wurde im Tripikat durchgeführt. Fehlerindikator bezieht sich auf den SEM. *=nicht detektierbare Expression; TCR¹⁶⁴⁰ gesund (n=3; weiß), TCR¹⁶⁴⁰ Tiere mit akuter EAE (EAE-Grad =4; n=3; rot), TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} mit chronischer EAE (EAE-Grad =2-3 für mind. 1 Woche; n=4; orange) und MOG₁₋₁₂₅-immunisierte SJL/J-Tiere mit akuter EAE (EAE-Grad >3; n=4; grau)



Es zeigte sich, dass in spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren sowie in kranken MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Tieren außer der mRNA-Expression von CD4 auch die von FoxP3 identifiziert werden konnte. FoxP3⁺CD4⁺-T-Zellen scheinen demzufolge ein fester Bestandteil der ZNS-infiltrierenden Lymphozytenpopulation in spontan erkrankten wie in experimentell induzierten Tieren zu sein.

In nachfolgender Abbildung ist eine FACS-Färbung der CD25⁺FoxP3⁺-T-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen der Milz, Lymphozyten und ZNS-infiltrierende Zellen von gesunden und spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren sowie TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren dargestellt.

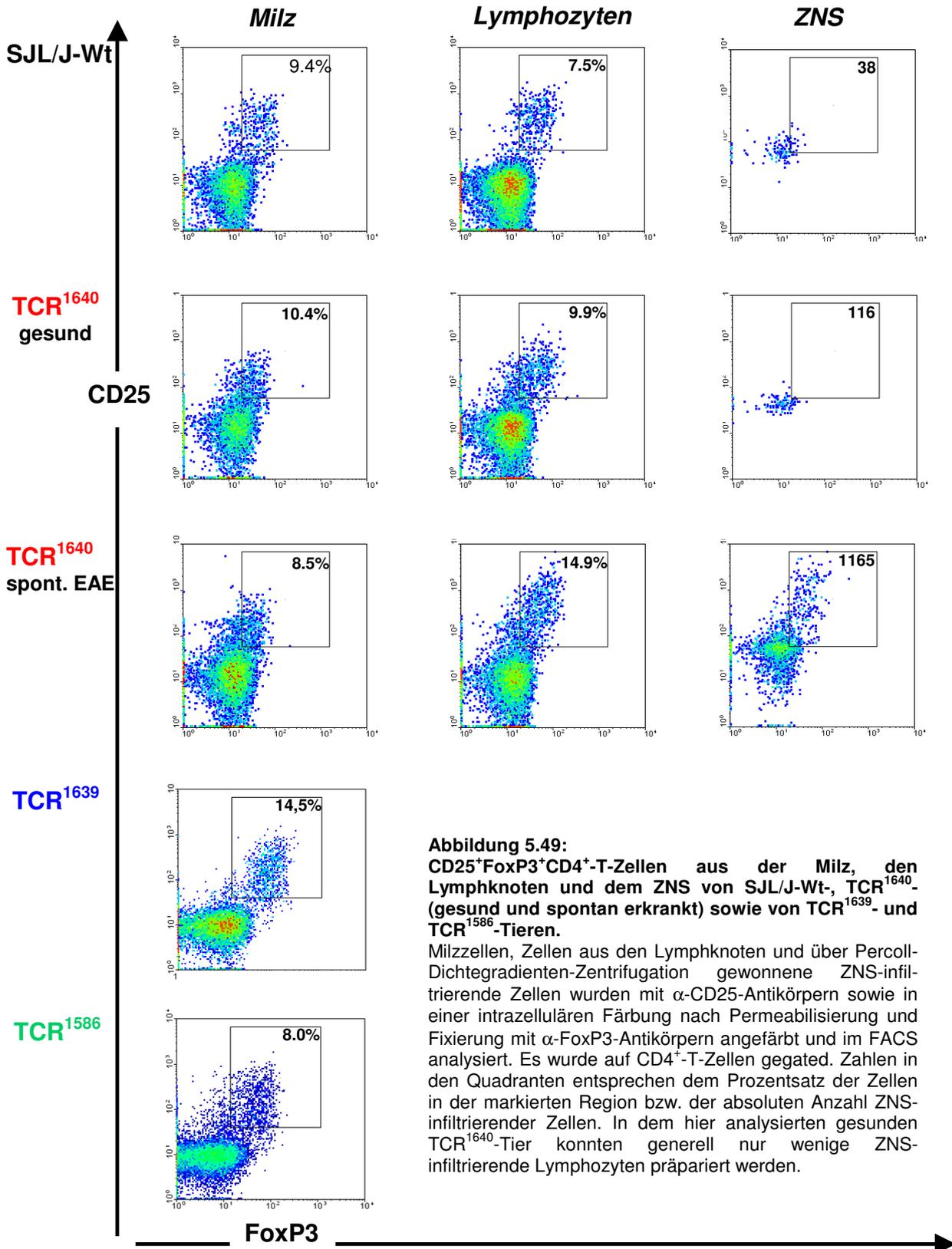


Abbildung 5.49: CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-T-Zellen aus der Milz, den Lymphknoten und dem ZNS von SJL/J-Wt-, TCR¹⁶⁴⁰- (gesund und spontan erkrankt) sowie von TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren.

Milzzellen, Zellen aus den Lymphknoten und über Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene ZNS-infiltrierende Zellen wurden mit α -CD25-Antikörpern sowie in einer intrazellulären Färbung nach Permeabilisierung und Fixierung mit α -FoxP3-Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. Es wurde auf CD4⁺-T-Zellen gated. Zahlen in den Quadranten entsprechen dem Prozentsatz der Zellen in der markierten Region bzw. der absoluten Anzahl ZNS-infiltrierender Zellen. In dem hier analysierten gesunden TCR¹⁶⁴⁰-Tier konnten generell nur wenige ZNS-infiltrierende Lymphozyten präpariert werden.

Wie Abbildung 5.49 zeigt, konnten CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-T-Zellen in allen drei transgenen Linien sowie in spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren nachgewiesen werden, wobei der Prozentsatz dieser Population, auch aufgrund der technischen Schwierigkeiten in der

FoxP3-FACS-Färbung, stark variierte (in SJL/J-Wt-Tieren z.B. zwischen 9,4% und 14%). Darüber hinaus ist mit dieser Art FACS-Färbung eine klare Trennung von CD25⁺- (IL-2-Rezeptor α -Kette) aktivierten T-Zellen und immunregulatorischen CD25⁺FoxP3⁺-T_{Reg}-Zellen schwierig, zumal auch in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren eine erhöhte Anzahl CD25⁺-T-Zellen gegenüber SJL/J-Wt-Tieren vorlag (siehe 5.2.4). Welche genaue Bedeutung den CD25⁺FoxP3⁺-T-Zellen in der spontanen EAE von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zukommt bzw. ob diese Zellen genauso funktionell wie entsprechende Zellen aus SJL/J-Wt-Tieren sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

5.3.12 Veränderungen im peripheren Immunsystem von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren

Wie oben beschrieben, kommt es im Verlauf der spontanen Erkrankung zur Einwanderung von Lymphozyten ins ZNS. Auch in der Milz dieser Tiere findet man zum Zeitpunkt der spontanen Erkrankung deutliche Veränderungen. Zum einen kommt es zu einer signifikanten Verkleinerung der Milz, zum anderen steigt der Anteil an CD4⁺- bzw. CD4⁺-TZR^{hoch}-T-Zellen in Milz und Lymphknoten an, was auf eine antigenspezifische Proliferation der transgenen T-Zellen zurückzuführen sein könnte. Nachfolgende Abbildung zeigt die Veränderung in der Milz von gesunden gegenüber spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren.

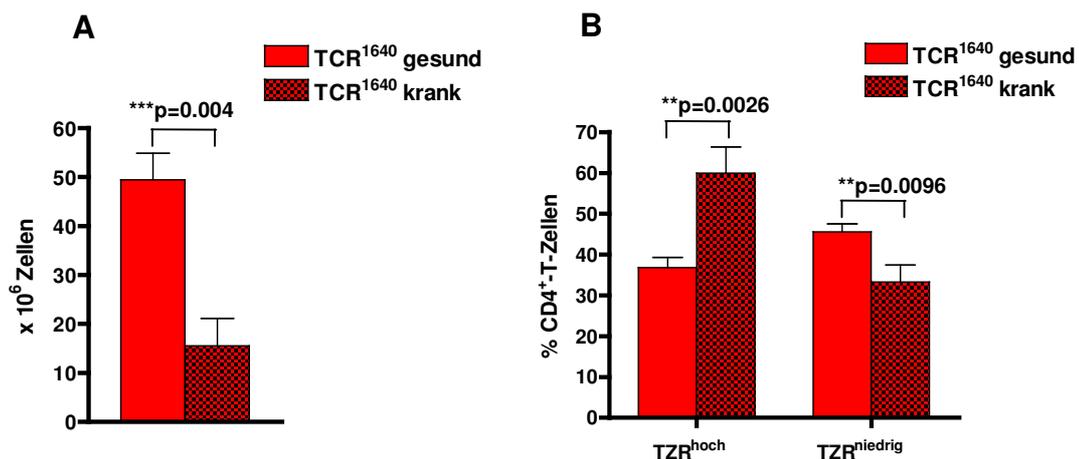


Abbildung 5.50: In spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren kommt es zu einer Verkleinerung der Milz und zu einem prozentualen Anstieg in der TZR^{hoch}-Population.

(A) Vergleich der Milzgrößen in 10⁶ Zellen; (B) Basierend auf vorangegangenen FACS-Analysen (mit α -CD4-, α -V α 8.3- und α -V β 4-Antikörpern) konnte die prozentuale Verteilung von CD4⁺-TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Zellen in der Milz untersucht werden. TCR¹⁶⁴⁰ gesund (n=7), TCR¹⁶⁴⁰ spontane EAE (n=6). Der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob der Unterschied signifikant war.

5.4 Die Rolle der B-Zellen in MOG-TZR-C3-transgenen Tieren

Im Unterschied zu den von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) beschriebenen doppelt-transgenen TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-C57BL/6 Tieren (Devic-Tieren) hatte das Verpaaren der TCR¹⁶⁴⁰-SJL-Tiere mit IgH^{MOG}-Tieren zu einer doppelt-transgenen F1-Generation, die MOG-spezifische T- und B-Zellen sowie Antikörper besaß, kaum Effekt auf die Ausbildung spontaner EAE. Denn bereits die in dieser Arbeit erzeugten einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-SJL-Tiere entwickelten zu einem sehr hohen Prozentsatz spontane EAE.

5.4.1 MOG-spezifische B-Zellen präsentieren in doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren bevorzugt MOG₁₋₁₂₅

Von Krishnamoorthy et al. (2006) war bekannt, dass transgene IgH^{MOG}-B-Zellen aus doppelt-transgenen TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-C57BL/6-Tieren (Devic-Tieren) das MOG₁₋₁₂₅-Protein deutlich effizienter den transgenen T-Zellen präsentieren können als Wildtyp-B-Zellen oder B-Zellen aus einfach-transgenen TCR^{MOG}-C57BL/6-Tieren. Die Antigenpräsentation des spezifischen MOG₃₅₋₅₅-Peptids (I-A^b) war in einfach- und doppelt-transgenen Tieren identisch. Der Grund dafür war, dass der transgene B-Zell-Rezeptor der IgH^{MOG}-B-Zellen ein konformationelles Epitop von MOG erkennt, welches nur im MOG₁₋₁₂₅-Protein, nicht aber im MOG₃₅₋₅₅-Peptid existent ist (Breithaupt et al., 2003). Da in C57BL/6-Tieren spontane EAE nur in doppelt-transgenen TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-Tieren, kaum aber in einfach-transgenen TCR^{MOG}-2D2-Mäusen auftrat, konnte diese präferentielle Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins ein Hinweis auf eine verstärkte T-B-Zell-Interaktion und damit auch erhöhte Autoreaktivität in diesen Tieren sein.

Da es zwischen einfach- und doppelt-transgenen SJL/J-Tieren kaum einen Unterschied in der Inzidenz, dem Verlauf und dem Zeitpunkt des Auftretens der ersten klinischen Symptome der spontanen EAE gab, sollte untersucht werden, ob es dennoch in doppelt-transgenen SJL/J-Tieren zum Zusammenspiel der IgH^{MOG}-B-Zellen mit den TCR¹⁶⁴⁰-T-Zellen kommt. Dazu wurde im Proliferationsassay die Reaktivität von Milzzellen aus doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- und einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰- bzw. IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren gegenüber dem MOG₁₋₁₂₅-Protein und MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid getestet. Es stellte sich heraus, dass es in Milzzellen aus doppelt-transgenen SJL/J-Tieren, ähnlich wie bei C57BL/6-Tieren, zu einer präferentiellen Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins kommt, in Zellen aus einfach-transgenen

TCR¹⁶⁴⁰-Tieren jedoch nicht. Selbst sehr geringe Mengen von MOG₁₋₁₂₅ (0.1 µg/ml) waren ausreichend, um in Milzzellen aus TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren eine deutlich messbare Reaktivität hervorzurufen. Um eine vergleichbare Reaktion in Zellen aus einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zu induzieren, waren hingegen weitaus höhere Konzentrationen nötig (siehe Abb. 5.51 A).

Im Unterschied zu C57BL/6 reagierten Milzzellen aus doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren auch gegenüber dem MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid etwas stärker als einfach-transgene TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tiere (siehe Abb. 5.51 B). Da in SJL/J-Mäusen das T-Zell-Epitop, 90-110As (I-A^S), mit dem B-Zell-Epitop der transgenen IgH^{MOG}-B-Zellen, 100-107As, von MOG überlappt (Breithaupt et al., 2003), wäre es möglich, dass auch das MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid in geringem Umfang von den transgenen IgH^{MOG}-B-Zellen gebunden und den T-Zellen präsentiert werden kann (siehe in Diskussion Abb. 6.1). Milzzellen aus einfach-transgenen IgH^{MOG}-Tieren zeigten in SJL/J- wie in C57BL/6-Tieren kaum Reaktivität gegenüber dem MOG₁₋₁₂₅-Protein und MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid.

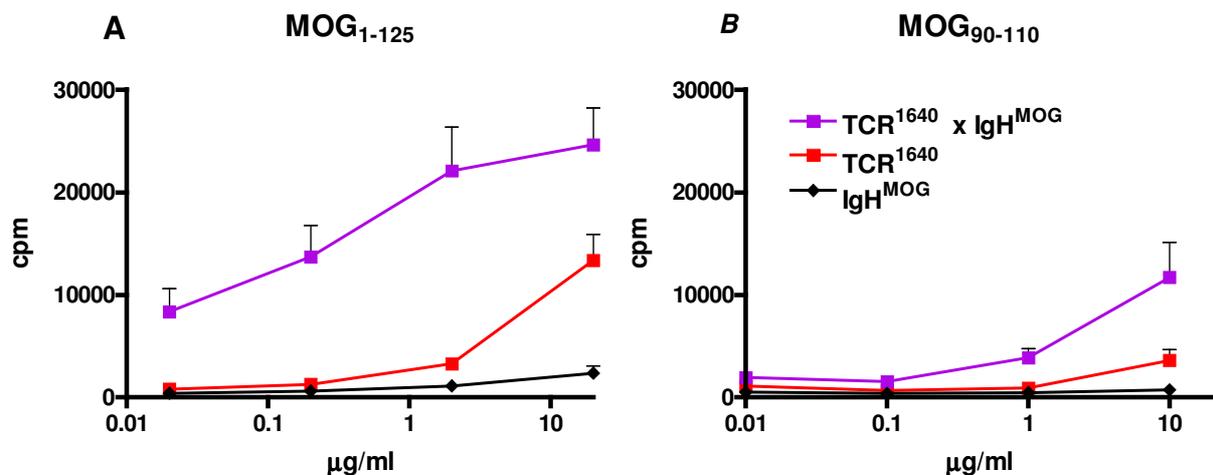


Abbildung 5.51:

Proliferationsassay mit Milzzellen aus doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- und einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰- bzw. IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren

2.5x10⁵ Milzzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von (A) MOG₁₋₁₂₅ bzw. (B) MOG₉₀₋₁₁₀ inkubiert und ein Proliferationsassay durchgeführt. Jede Messung wurde im Triplikat durchgeführt; Fehlerindikator= SEM; cpm= engl.: counts per minute; TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} (n=6), TCR¹⁶⁴⁰ (n=5), und IgH^{MOG} (n=4)

Dieser Effekt der „präferentiellen Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins“ konnte von Krishnamoorthy et al. (2006) auch hinsichtlich der Zytokin-Sekretion beobachtet werden, da Milzzellen von doppelt-transgenen TCR^{MOG} x IgH^{MOG}-C57BL/6-Devis-Tieren auch bei sehr geringer MOG₁₋₁₂₅-Konzentration noch deutlich messbare Mengen IFN γ , IL-2 und IL-17 produzierten, solche aus TCR^{MOG}-C57BL/6-Tieren jedoch nicht (Krishnamoorthy et al., 2006). Um diesen Effekt in SJL/J-Tieren zu analysieren, wurden Milzzellen von TCR¹⁶⁴⁰- und

TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren in Gegenwart von MOG₁₋₁₂₅-Protein bzw. MOG₉₀₋₁₁₀-Peptid (I-A^S) kultiviert und die in den Überstand sezernierten Zytokine mittels Sandwich-ELISA bestimmt (siehe Abb. 5.52).

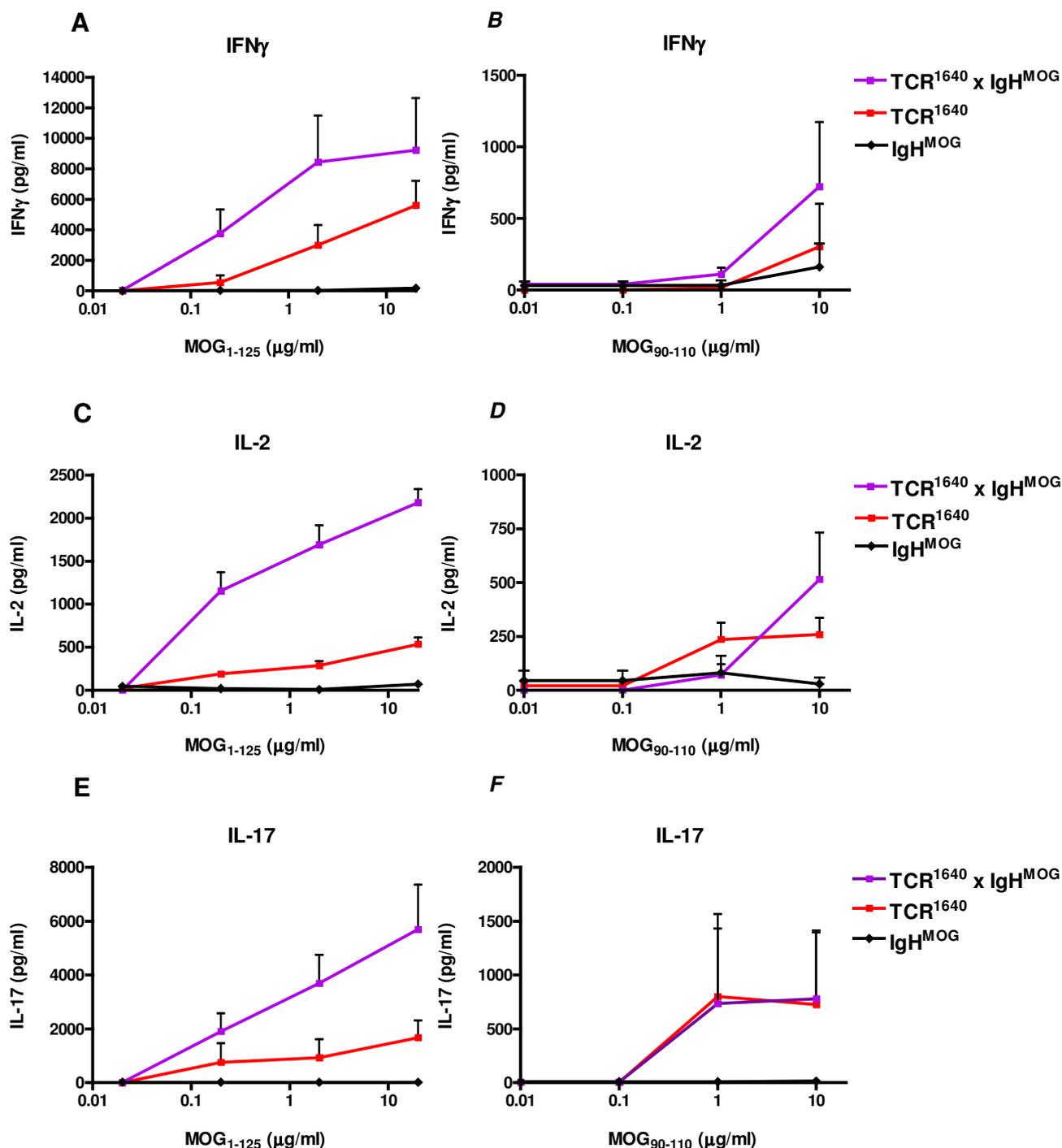


Abbildung 5.52:

Milzzellen von doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren produzieren nach MOG₁₋₁₂₅-Stimulation effizienter IFN γ , IL-2 und IL-17 als Zellen von einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-Tieren.

2.5x10⁵ Milzzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von MOG₁₋₁₂₅ (A, C, E) bzw. MOG₉₀₋₁₁₀ (B, D, F) für 72 Std. inkubiert und die in den Kultur-Überstand sezernierten Zytokine mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die absoluten Mengen an IFN γ (A, B), IL-2 (C, D) und IL-17 (E, F) wurden anhand einer Standardkurve berechnet, in der das jeweilige rekombinant hergestellte Zytokin als Standard verwendet wurde. In drei unabhängigen Experimenten wurden TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- (n=6), TCR¹⁶⁴⁰- (n=5) bzw. IgH^{MOG}-Tiere (n=2) analysiert. Fehlerindikator=SEM

Wie das Ergebnis aus den oben dargestellten ELISAs zeigt, produzierten auch in SJL/J-Tieren Milzzellen von $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -Mäusen nach Stimulation mit MOG₁₋₁₂₅-Protein effizienter $IFN\gamma$, IL-2 und IL-17 als solche aus einfach-transgenen TCR^{1640} -Tieren. Demnach findet auch in doppelt-transgenen $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -SJL/J-Mäusen, sowohl auf der Ebene der Proliferation als auch auf der Ebene der Zytokine, die aus den Devic-Tieren bekannte präferentiellen Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins statt, obwohl sich die spontane EAE zwischen einfach- und doppelt-transgenen Tieren nicht wesentlich unterscheidet. Deshalb bleibt zumindest für SJL/J-Mäuse die Relevanz dieser *in vitro* beobachtete T-B-Zell-Kooperation für das Auftreten von spontaner EAE fraglich.

5.4.2 Anti-MOG-Autoantikörper in doppelt-transgenen $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -Tieren

Bereits aus den $TCR^{MOG} \times IgH^{MOG}$ -Devic-Tieren war bekannt, dass die Anwesenheit von MOG-spezifischen B- und T-Zellen wechselseitige Auswirkungen sowohl auf die B-Zell- als auch auf die T-Zell-Immunität hat. Aufgrund der Anwesenheit der MOG-spezifischen IgH^{MOG} -B-Zellen kommt es, wie oben beschrieben, zur sogenannten „präferentiellen Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins, so dass auch kleinste Mengen des MOG₁₋₁₂₅-Proteins zur Stimulation der MOG-spezifischen T-Zellen ausreichen. Aber auch auf Seiten der B-Zellen kommt es bei Anwesenheit von MOG-spezifischen T-Zellen zur Veränderung, insbesondere konnte ein Anstieg der transgenen MOG-spezifischen Antikörper des IgG1-Isotyps beobachtet werden (Krishnamoorthy et al., 2006). Während transgene MOG-spezifische Antikörper des IgM-Isotyps auch im Serum von IgH^{MOG} -Tieren gefunden werden konnten, war die Menge an MOG-spezifischen Antikörpern vom IgG1-Isotyp in diesen Tieren relativ gering. Im Unterschied dazu konnte im Serum von $TCR^{MOG} \times IgH^{MOG}$ -Devic-Tieren MOG-spezifische Antikörper des IgM- und IgG1-Isotyps nachgewiesen werden, und zwar unabhängig vom klinischen Status der analysierten Tiere. Da der transgene IgH^{MOG} -Antikörper den a-Allotyp, endogene Antikörper von SJL/J-Tieren jedoch den b-Allotyp haben, können mit Allotyp-spezifischen Antikörpern endogene und transgene Antikörper voneinander unterschieden werden. Nachfolgend ist das Resultat eines ELISAs dargestellt, in welchem das Serum von doppelt-transgenen $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ - sowie einfach-transgenen TCR^{1640} - und IgH^{MOG} -SJL/J-Tieren auf Anwesenheit MOG-spezifischer Antikörper vom a-Allotyp getestet wurde. Es stellte sich heraus, dass es wie in den Devic-Tieren auch in

doppelt-transgenen SJL/J-Tieren zu einem verstärkten Auftreten transgener MOG-spezifischer Antikörper vom IgG1-Isotyp kommt (siehe Abb. 5.53; siehe Doppelpfeil).

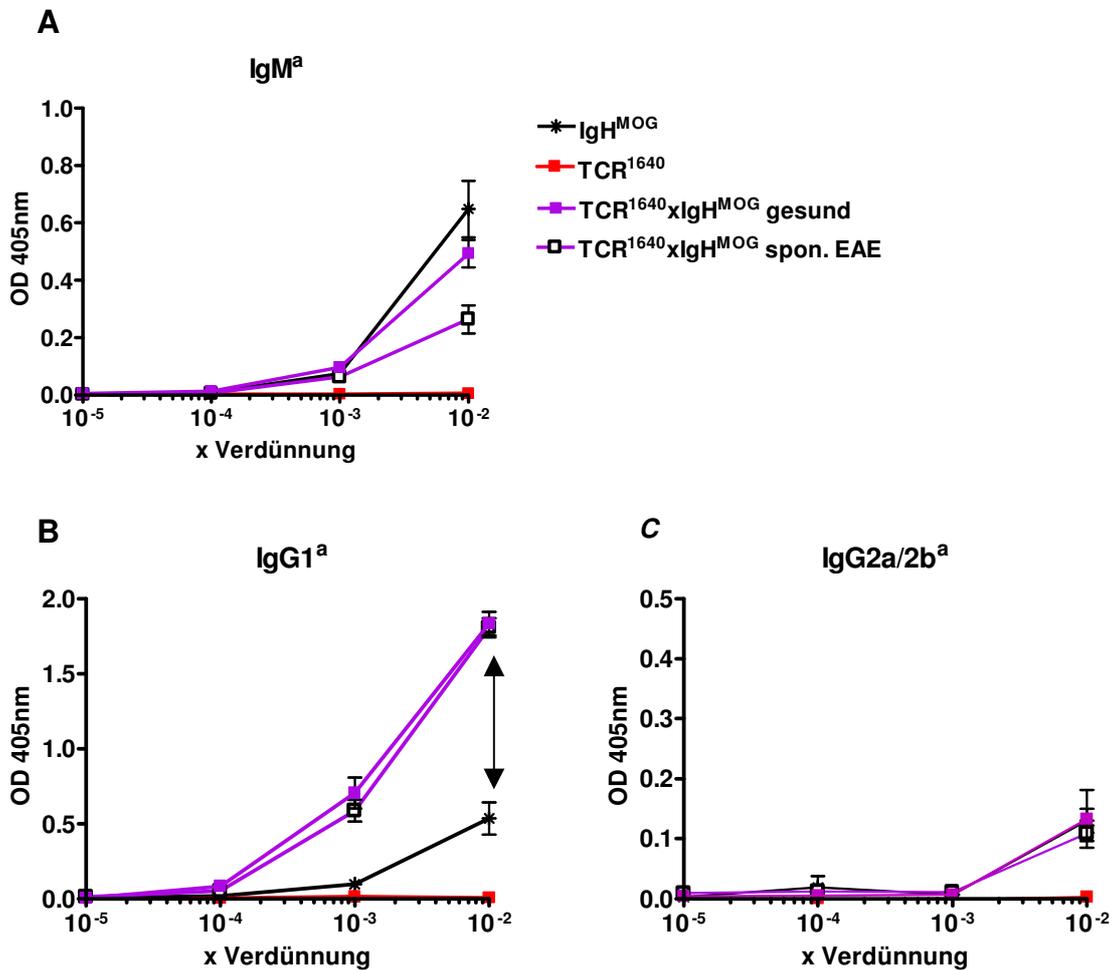


Abbildung 5.53:

Im Serum von doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren treten verstärkt MOG-bindende Antikörper des IgG1^a-Isotyps auf.

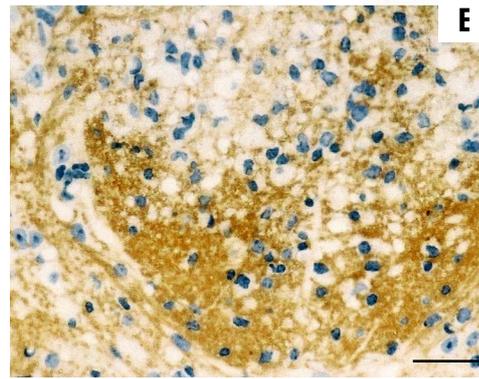
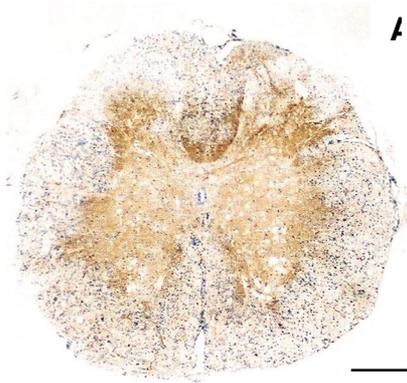
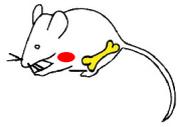
Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG₁₋₁₂₅ (10 µg/ml) beschichtet und mit Serum in verschiedenen Konzentrationen für 2 Std. inkubiert. Für den Nachweis von (A) IgM^a, (B) IgG1^a, (C) IgG2a/2b^a im ELISA wurden a-Allotyp-spezifische Antikörper verwendet. TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} gesund (n=6), spon. EAE TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- (n=6), TCR¹⁶⁴⁰- (n=5) bzw. IgH^{MOG}-Tiere (n=5) analysiert. Fehlerindikator=SEM

5.4.3 Immunglobuline in ZNS-Läsionen von $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ - und TCR^{1640} -Tieren

Die histologische Analyse der spontan erkrankten einfach- und doppelt-transgenen Tieren ergab, dass in beiden Fällen eine sehr stark ausgeprägte Demyelinisierung vorlag, die mitunter zur völligen Entmarkung ganzer Gehirnareale führte (siehe Abb. 5.40). Einer der möglichen Mechanismen, wie Demyelinisierung vonstatten gehen kann, ist über die sogenannte Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität, ADCC (engl.: antibody-dependant cellular cytotoxicity). Dabei werden antikörperbeladene Ziel-Zellen, im Fall der Demyelinisierung sind das die Oligodendrozyten, durch Fc-Rezeptor-tragende Immunzellen, wie z.B. NK-Zellen und Makrophagen, zerstört. Obwohl auch in den von Krishnamoorthy et al. (2006) beschriebenen doppelt-transgenen C57BL/6-Tieren eine starke Demyelinisierung vorlag, konnte in den Tieren keine Ablagerung von Immunglobulin in den betroffenen ZNS-Arealen gefunden werden. Im Rahmen der histologischen Analyse der spontan erkrankten $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -SJL/J-Tiere konnten jedoch Immunglobuline (Ig) in den betroffenen ZNS-Arealen nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.54 A und B). Das war neu, aber aufgrund der transgenen Expression der schweren Kette des bekanntlich demyelinisierenden Antikörpers 8.18C5 in diesen Tieren nicht weiter verwunderlich.

Überraschenderweise konnte aber auch im ZNS von spontan erkrankten einfach-transgenen TCR^{1640} -Tieren Immunglobuline gefunden werden, obwohl diese Tiere in ihrem B-Zell-Repertoire unverändert waren, d.h. keine transgenen MOG-spezifischen Antikörper exprimierten (siehe Abb. 5.54 C und D). Es scheint, dass das Ausmaß der Ig-Deposition in den doppelt-transgenen Tieren stärker war als in den einfach-transgenen Tieren (vergleiche Abb. 5.54 A und B mit C und D), es wurden aber diesbezüglich keine weiteren Studien durchgeführt.

TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}



TCR¹⁶⁴⁰

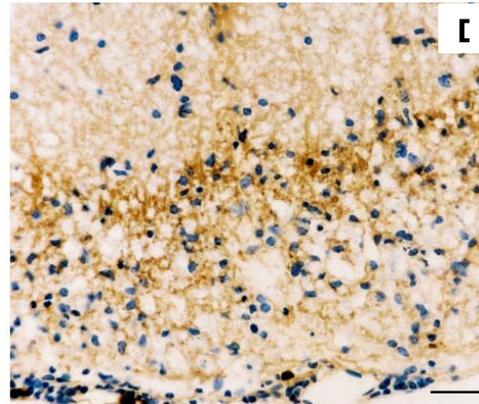
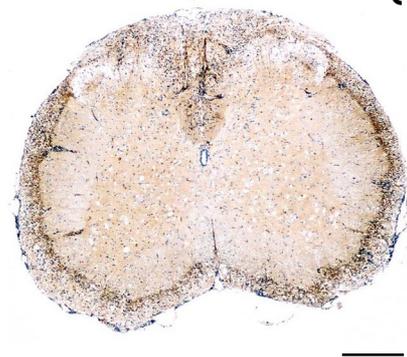
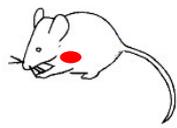


Abbildung 5.54:

Immunglobuline im ZNS von spontan erkrankten, doppelt transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- (#6476) und einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen (#6146) (Prof. H. Lassmann)

Im Rückenmark von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}- und TCR¹⁶⁴⁰-Tieren konnten in immunhistologischen Färbungen mit α -Ig-Antikörpern (α -IgM, α -IgG und α -IgA) Immunglobuline nachgewiesen werden, die an ZNS-Gewebe gebunden waren. Der Größenmaßstab entspricht in (A) und (C) 200 μ m und in (B) 25 μ m und (D) 50 μ m.

Dass auch im ZNS der spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tiere im Zusammenhang mit der starken Demyelinisierung abgelagerte Immunglobuline identifiziert werden konnten, war ein erster Hinweis darauf, dass möglicherweise auch den B-Zellen der einfach-transgenen TCR¹⁶⁴⁰-Tiere eine besondere Rolle in der spontanen EAE zukommt.

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von B-Zellen ergab die Bestimmung der absoluten Antikörpertiter der verschiedenen Isotypen im Serum von gesunden und spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, waren die absoluten Titer von IgM, IgG2a, IgG2b und IgG3 in den spontan-erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren signifikant gegenüber gesunden und SJL/J-Wt-Tieren erhöht (siehe Abb. 5.55).

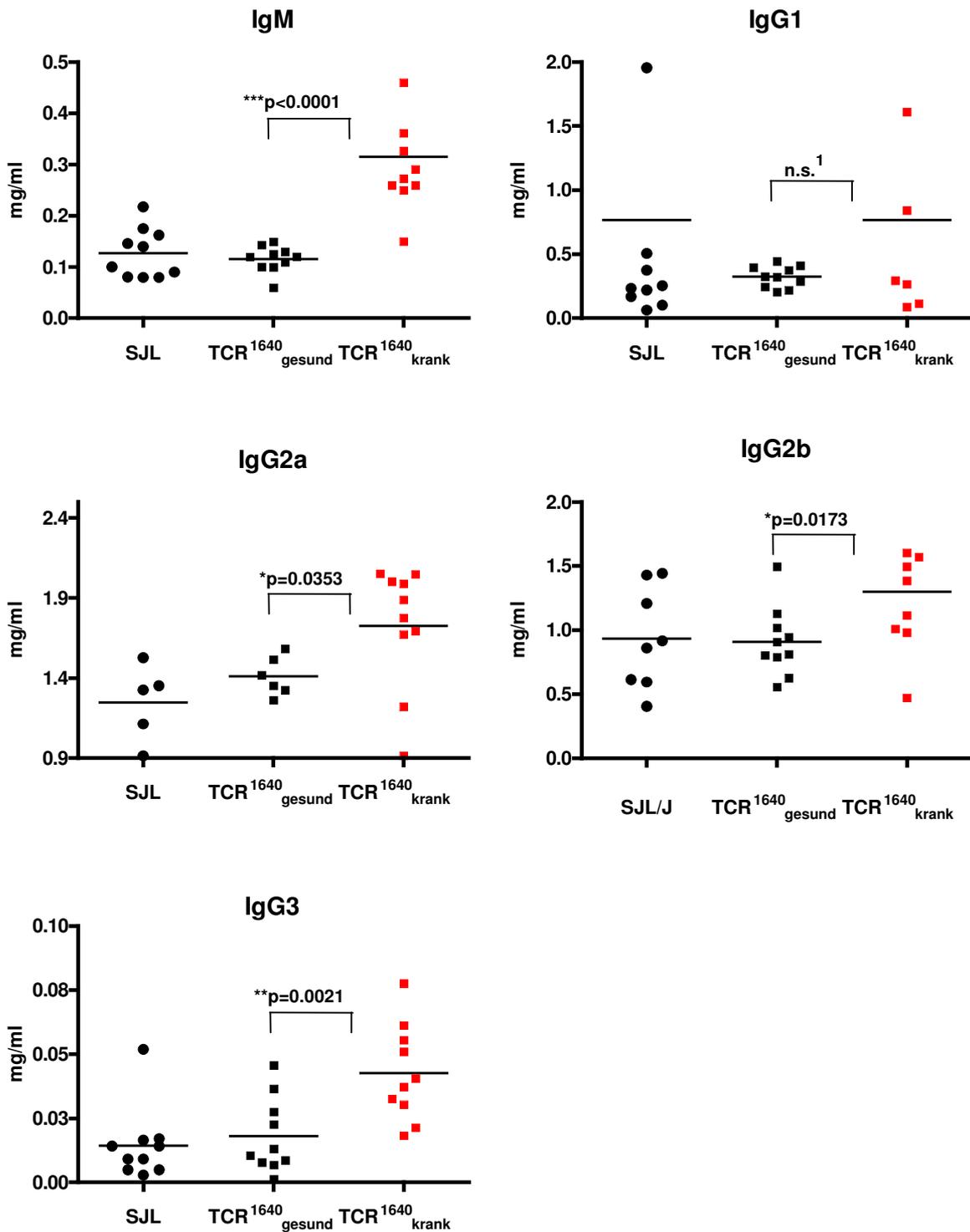


Abbildung 5.55:

Der Antikörpertiter von IgM, IgG2a, IgG2b und IgG3 ist in spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren erhöht.

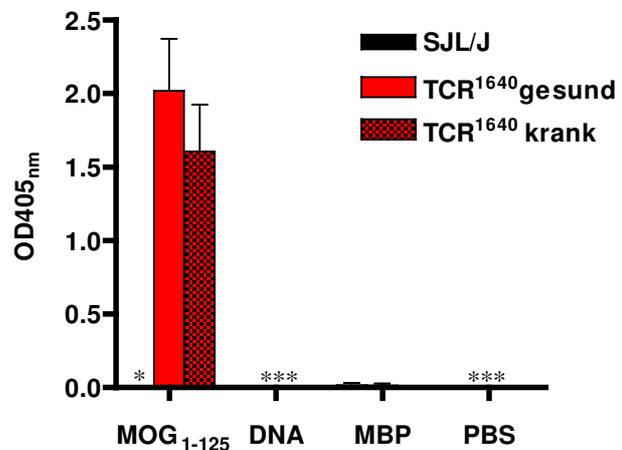
Mittels Sandwich-ELISA wurde der Titer der verschiedenen Isotypen im Serum von SJL/J-Wt- (n=10), gesunden TCR¹⁶⁴⁰- (8-10 Wochen alt; n=10) und spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren (n=10) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standardkurve, die mit gereinigten Antikörpern der einzelnen Isotypen errichtet wurde. Für die Bestimmung der **IgM**-Konzentration wurde das Serum 1/1250; für **IgG1** 1/5000; für **IgG2a** 1/1000; für **IgG2b** 1/1250 und für **IgG3** 1/250 verdünnt. Der Student t-Test (Konfidenzintervall von 95%) wurde angewandt, um zu überprüfen, ob die Differenzen signifikant waren; ¹p=0,0517

5.4.4 MOG-spezifische Autoantikörper in TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J-Tieren

Die histologische Analyse spontan erkrankter TCR¹⁶⁴⁰-Tiere zeigte, dass in den Läsionen Immunglobuline zu finden waren, die an ZNS-Gewebe gebunden hatten. Darüber hinaus kam es zu einem Anstieg im absoluten Antikörpertiter bestimmter Isotypen. Um zu überprüfen, ob es im Zusammenhang mit der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zur Neubildung von Autoantikörpern kam, wurden die Antikörper im Serum der Tiere auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber bestimmten Autoantigenen wie MOG, MBP und genomische DNA im ELISA getestet (siehe Abb. 5.56).

Abbildung 5.56:
MOG-bindende IgG1^b-Antikörper im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren

Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG₁₋₁₂₅ (10 µg/ml), genomischer DNA (4 µg/ml), MBP (10 µg/ml) oder nur PBS beschichtet und mit 1/50 verdünntem Serum von SJL/J-Wt- (n=5), gesunden TCR¹⁶⁴⁰- (EAE=0; n=5, Alter 8-10 Wochen), spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰- (n=5) Tieren 2 Std. bei RT inkubiert. Der Nachweis gebundener IgG1-b-Allotyp-spezifischer Antikörper erfolgte mittels ELISA. Fehlerindikator=SEM; * = nicht detektierbar



Es stellte sich heraus, dass im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-, nicht aber von SJL/J-Wt-Tieren MOG₁₋₁₂₅-spezifische Antikörper vom IgG1^b-Isotyp nachweisbar waren, unabhängig davon, ob die Tiere spontan erkrankt waren oder nicht. Es konnten keine IgG1^b-Antikörper gefunden werden, die an genomische DNA bzw. an rekombinant hergestelltes MBP (Rattensequenz) binden.

Immunisiert man SJL/J-Wt-Tiere mit der extrazellulären Domäne von MOG, MOG₁₋₁₂₅, kommt es zur Bildung MOG-spezifischer Antikörper, die sich im Serum der Tiere nachweisen lassen. Vergleicht man das Serum von MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt- mit dem von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, findet man in beiden Gruppen MOG-spezifische Antikörper des Isotyps IgG1^b, IgG2a^b und IgG2b^b zu vergleichbaren Titern. Wie in nachfolgender Abbildung dargestellt, war es jedoch nicht möglich, MOG-spezifische Antikörper vom IgM^b-Isotyp zu finden. Das Gleiche galt für Antikörper vom IgG3- und IgD-Isotyp (nicht dargestellt).

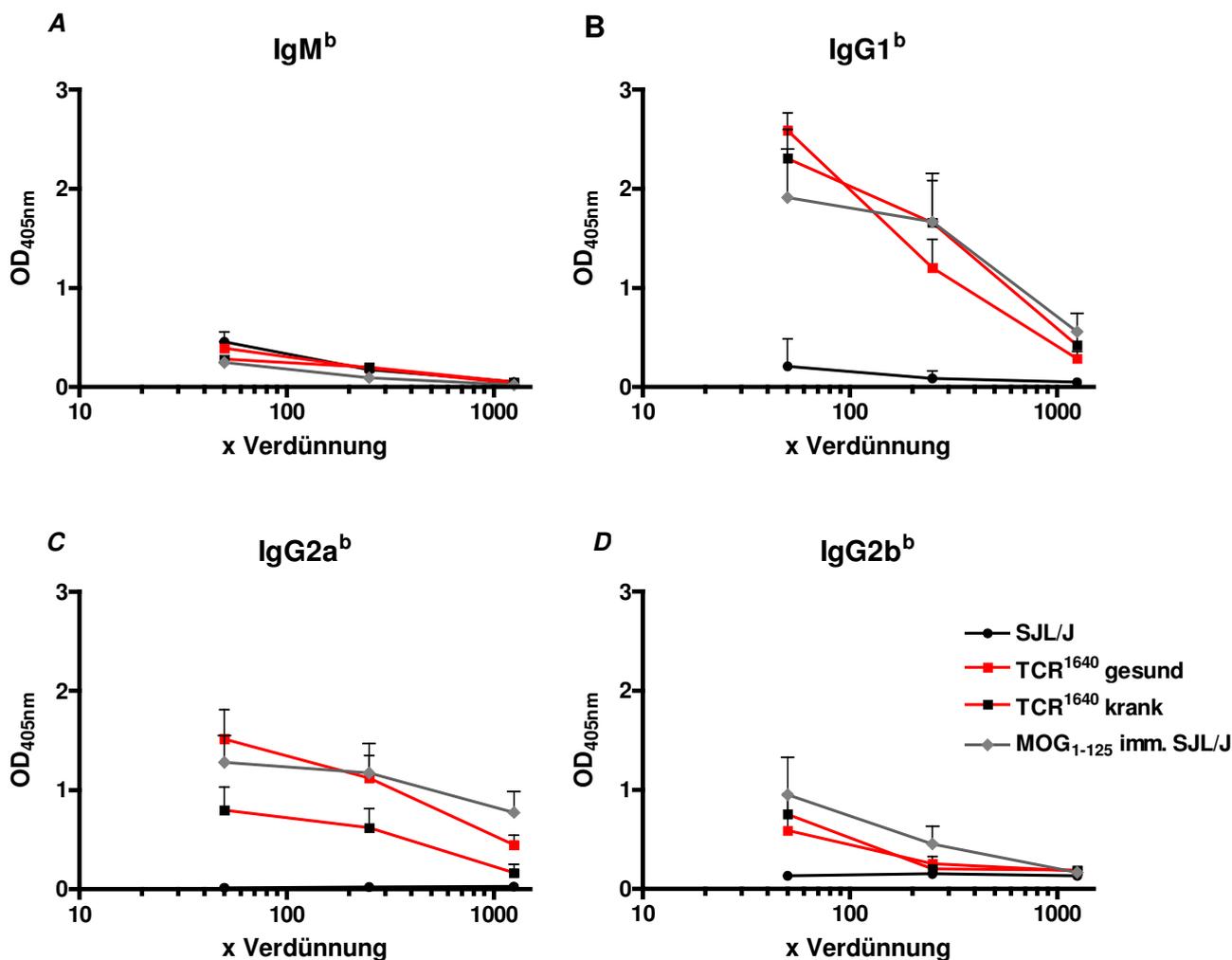


Abbildung 5.57:

Serum von TCR^{1640} -Tieren enthält, wie das von MOG_{1-125} -immunisierten SJL/J-Wt-Tieren, MOG-spezifische Antikörper vom Isotyp $IgG1^b$ und $IgG2a/2b^b$.

Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG_{1-125} (10 μ g/ml) beschichtet und mit Serum in verschiedenen Konzentrationen für 2 Std. inkubiert. Der Nachweis gebundener (A) IgM^b , (B) $IgG1^b$, (C) $IgG2a^b$ und (D) $IgG2b^b$ Antikörper erfolgte mittels ELISA. SJL/J-Wt- (n=6); TCR^{1640} - (gesund, n=6, Alter 8-10 Wochen); TCR^{1640} - (krank, n=6); MOG_{1-125} -immunisierte SJL/J-Wt-Tiere (n=6); Fehlerindikator=SEM

Da $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -Tiere heterozygot, $IgH^{MOG/+}$, waren, gab es in diesen Tieren noch ca. 10% endogene Wildtyp-B-Zellen vom b-Allotyp. Die Analyse des Serums von doppelt-transgenen $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -Tieren ergab, dass sich erstaunlicherweise auch in diesen Tieren, neben den transgenen MOG-spezifischen Antikörpern vom a-Allotyp (siehe Abb. 5.53), endogene MOG-spezifische Immunglobuline vom b-Allotyp befanden, wenn auch zu einem geringeren Titer als in TCR^{1640} -Tieren (siehe Abb. 5.58).

Um zu überprüfen, ob die MOG-spezifischen Antikörper im Serum von TCR^{1640} -Tieren im Zusammenhang mit einer MOG-spezifischen B-Zell-Antwort stehen und nicht auf einer unspezifischen Kreuzreaktivität beruhen, wurde das Serum von MOG-defizienten $TCR^{1640} \times MOG^{-/-}$ -Tieren auf Anwesenheit dieser Antikörper getestet. In $TCR^{1640} \times MOG^{-/-}$ -Tieren

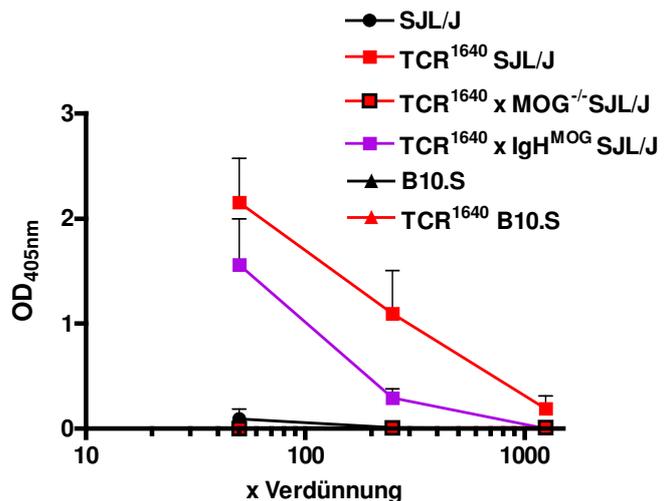
konnten keine MOG-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.58).

Dass der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle für das Auftreten der spontanen EAE spielt, konnte in dieser Arbeit mit den Studien an TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J- und TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren gezeigt werden. Beide Linien stammen vom selben TCR¹⁶⁴⁰-Founder ab und wurden sowohl auf den EAE-anfälligen SJL/J- als auch auf den EAE-resistenteren B10.S-Stamm zurückgekreuzt, wobei beide Stämme den gleichen MHC-Haplotyp (I-A^S) trugen. Im Unterschied zur *RR-Maus* TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J trat in TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren nur vereinzelt spontane EAE auf. Um zu überprüfen, ob das Auftreten der MOG-spezifischen Antikörper im Zusammenhang mit der genetischen Disposition zu spontaner EAE steht, wurde das Serum von TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren auf Anwesenheit MOG-spezifischer Antikörper untersucht und es konnten interessanterweise auch keine MOG-spezifischen Antikörper gefunden werden (siehe Abb. 5.58).

Abbildung 5.58:

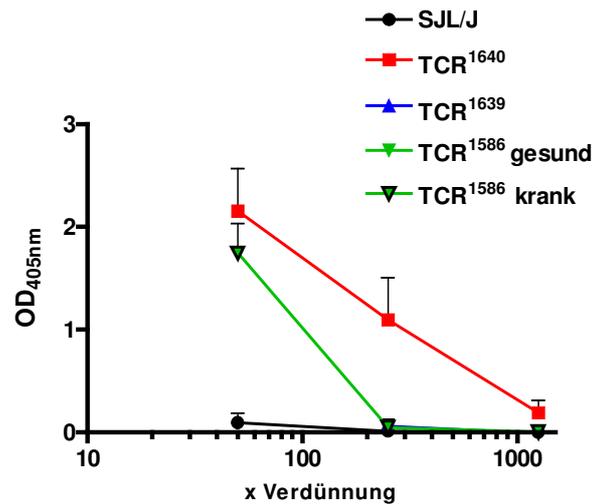
Im Serum von TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J konnten MOG-spezifische IgG1^b-Antikörper detektiert werden, nicht jedoch im Serum von TCR¹⁶⁴⁰ x MOG^{-/-}- oder TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren.

Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG₁₋₁₂₅ (10 µg/ml) beschichtet und Serum in verschiedenen Konzentrationen für 2 Std. bei RT inkubiert. Die Detektion gebundener IgG1^b-Antikörper erfolgte mittels ELISA mit einem b-Allotyp-spezifischen sekundären Antikörper. Getestet wurden Seren von SJL/J (n=5); TCR¹⁶⁴⁰ SJL/J (EAE=0, n=5); TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} (EAE=0, n=5); TCR¹⁶⁴⁰ x MOG^{-/-} (n=3); B10.S (n=5); TCR¹⁶⁴⁰ B10.S (n=5). Alle Tiere waren mindestens 9 Wochen alt. Fehlerindikator=SEM



Im Unterschied zur TCR¹⁶⁴⁰-Linie, in der die meisten Tiere spontan EAE entwickelten, trat in der TCR¹⁶³⁹-„Medium frequency-Linie“ keine spontane EAE auf. Wie bereits beschrieben (siehe Tab. 5.26), gab es jedoch interessanterweise in der TCR¹⁵⁸⁶-„Low frequency-Linie“ einige Fälle spontaner EAE. Das Serum von TCR¹⁶³⁹-Mäusen, gesunden sowie spontan erkrankten TCR¹⁵⁸⁶-Tieren, wurde im ELISA auf Anwesenheit MOG-spezifischer Antikörper getestet. Dabei zeigte sich, dass im Serum von TCR¹⁶³⁹- und gesunden TCR¹⁵⁸⁶-Tieren keine MOG-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, interessanterweise aber im Serum von TCR¹⁵⁸⁶-Tieren, in denen spontane EAE aufgetreten war (siehe Abb.5.59). Somit gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten spontaner EAE und der Ausbildung MOG-spezifischer Antikörper.

Abbildung 5.59:
Nur im Serum von TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁵⁸⁶-Tieren mit spontaner EAE können MOG-spezifische Antikörper detektiert werden.
 Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG₁₋₁₂₅ beschichtet und mit Serum in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Detektion gebundener IgG^b-spezifischer Antikörper erfolgte mittels ELISA. Getestet wurden Seren von SJL/J-Wt- (n=5), TCR¹⁶⁴⁰- (EAE=0, n=5), TCR¹⁶³⁹- (n=5), TCR¹⁵⁸⁶- (gesund; n=4) sowie TCR¹⁵⁸⁶-Tieren mit spontaner EAE (n=3). Alle Tiere waren mindestens 9 Wochen alt. Fehlerindikator=SEM



Um Hinweise auf eine mögliche Relevanz der MOG-spezifischen Antikörper *in vivo* zu bekommen, wurde das Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren auf seine Fähigkeit getestet, natives MOG, das auf der Oberfläche von EL4-Zellen exprimiert wird, zu binden. Dazu wurde das Serum der Tiere mit MOG-exprimierenden EL4-Zellen, EL4-MOG- bzw. EL4-Wt-Zellen inkubiert. An die EL4-Zellen gebundene Antikörper konnten anschließend in einer FACS-Analyse mit Isotyp-spezifischen Antikörpern detektiert werden. Nachfolgende Abbildung zeigt das Resultat aus solch einem EL4-MOG-Bindungstest, in dem Serum von SJL/J-Wt-, TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren sowie gereinigter 8.18C5-Antikörper verwendet wurde.

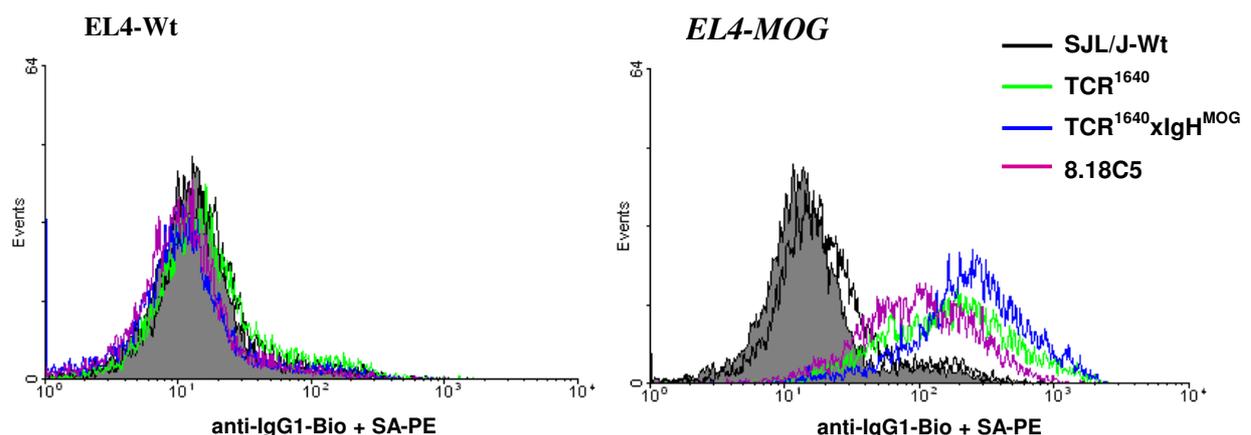


Abbildung 5.60:
Antikörper aus dem Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren binden an MOG, das auf der Oberfläche von EL4-Zellen exprimiert wird.
 EL4-Wt-Zellen (links) bzw. MOG-exprimierende EL4-Zellen, EL4-MOG (rechts) wurden mit Serum von SJL/J-Wt (schwarz), TCR¹⁶⁴⁰ (grün) und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG} (blau) (je 1/200 verdünnt) bzw. gereinigtem 8.18C5-Antikörper (0,5 µg/ml, violett) 45 min inkubiert, nicht gebundener Antikörper abgewaschen und mit biotinyliertem IgG1-spezifischem Antikörper (Allotyp-*unspezifisch*) und Streptavidin-PE im FACS detektiert.

An den Zellen gebundener Antikörper konnte mit einem biotinylierten IgG1-spezifischen Antikörper in Kombination mit PE-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen werden. In diesem Experiment wird der Allotyp der Antikörper nicht unterschieden, so konnte auch der gereinigte MOG-spezifische Antikörper 8.18C5 (a-Allotyp) als Kontrolle mitgeführt werden. Wie dargestellt konnte mit dem 8.18C5-Antikörper (0,5 µg/ml) eine Bindung an natives MOG dargestellt werden. Auch die im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren enthaltenen Antikörper zeigten eine Bindung an natives MOG, ebenso wie die im Serum von TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren enthaltenen transgenen (IgH^{MOG}) und endogenen MOG-bindenden Antikörper, die hier nicht unterschieden werden. Das Serum von SJL/J-Wt-Tieren enthielt keine Antikörper, die an EL4-MOG-Zellen binden konnten.

Oben dargestellte Ergebnisse zeigen, dass es nur in TCR¹⁶⁴⁰- und spontan erkrankten TCR¹⁵⁸⁶-Tieren zur Bildung MOG-spezifischer Antikörper kam und dass diese Antikörper an natives MOG auf der Zelloberfläche binden konnten. In TCR¹⁶⁴⁰-Tieren waren diese Antikörper auch in gesunden 8 bis 10 Wochen alten Tieren auffindbar, was insofern nicht verwunderlich war, als die histologische Analyse gezeigt hatte, dass auch in gesunden TCR¹⁶⁴⁰-Tieren dieses Alters zelluläre Infiltrate und Entmarkungsvorgänge im ZNS vorhanden waren (siehe Abb.5.46). Um zu überprüfen, ab welchem Zeitpunkt im Leben eines TCR¹⁶⁴⁰-Tieres MOG₁₋₁₂₅-spezifische Antikörper im Serum nachweisbar waren, wurden Seren verschieden alter, gesunder TCR¹⁶⁴⁰-Tiere im ELISA auf Anwesenheit MOG-spezifischer IgG1^b- und IgG2a/2b^b-Antikörper analysiert (siehe Abb. 5.61).

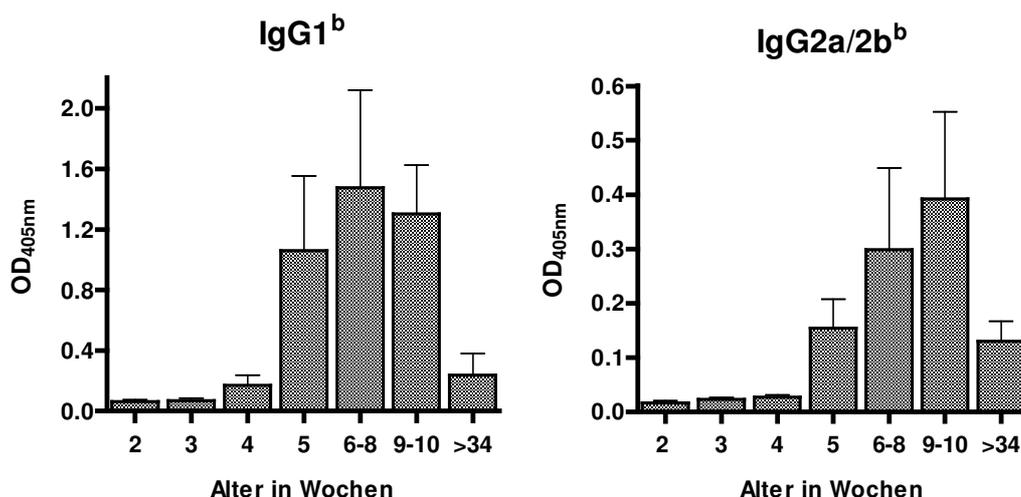


Abbildung 5.61:
MOG-spezifische IgG1^b- und IgG2a/2b^b-Antikörper waren ab einem Alter von 4-5 Wochen im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren nachweisbar.

Multisorb-ELISA-Platten wurden mit MOG₁₋₁₂₅ (10 µg/ml) beschichtet und mit Serum (1/100 verdünnt) verschieden alter TCR¹⁶⁴⁰-Tiere 2 Std. bei RT inkubiert. Die Detektion gebundener IgG1^b- bzw. IgG2a/2b^b-Antikörper erfolgte mittels ELISA. 2 Wochen (n=5); 3 Wochen (n=4); 4 Wochen (n=4); 5 Wochen (n=5); 6-8 Wochen (n=3); 9-10 Wochen (n=5); >34 Wochen (n=3). Alle getesteten Seren stammen aus gesunden Tieren. Fehlerindikator=SEM

Bereits ab einem Alter von vier bis fünf Wochen waren in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren MOG-spezifische Antikörper nachweisbar. Möglicherweise kommt es bereits in diesem Alter, bedingt durch die transgenen autoaggressiven MOG-spezifischen T-Zellen, zu subklinischen Entzündungsprozessen im ZNS, woraufhin es zur Aktivierung MOG-spezifischer B-Zellen und zur Produktion MOG-spezifischer Autoantikörper kommt. Interessant war, dass in den alten „EAE-resistenten“ Tieren (>34 Wochen ohne spontane EAE) der Titer der MOG-spezifischen Antikörper im Serum gegenüber den jüngeren Tieren deutlich reduziert war.

Anschließend wurde versucht, MOG-bindende B-Zellen direkt darzustellen, indem Milzzellen, Lymphozyten und ZNS-infiltrierende Zellen mit α -CD19-Antikörpern sowie mit biotinyliertem-MOG und Streptavidin-APC angefärbt und im FACS analysiert wurden (siehe Abb. 5.62).

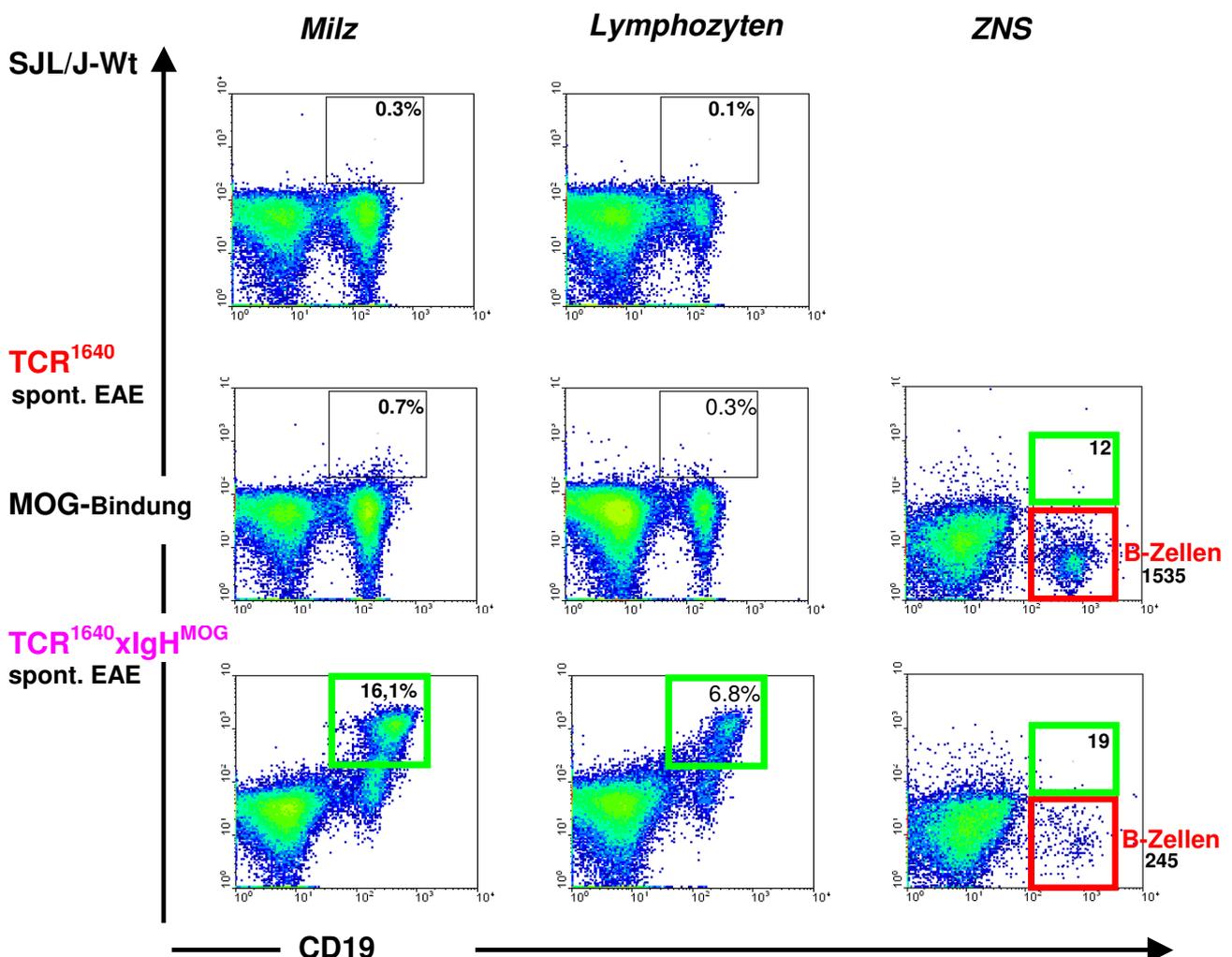


Abbildung 5.62:
MOG-bindende B-Zellen in Milz, Lymphknoten und ZNS von SJL/J-Wt-, TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren

Milzzellen, Zellen aus den Lymphknoten und über Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnene ZNS-infiltrierende Zellen wurden mit α -CD19-Antikörpern sowie mit biotinyliertem-MOG und Streptavidin-APC angefärbt und im FACS analysiert. Zahlen in der markierten Region entsprechen dem Prozentsatz der Zellen in diesem Bereich bzw. der absoluten Anzahl ZNS-infiltrierender Zellen; MOG-bindende B-Zellen (dargestellt in der grünen Region), B-Zellen (dargestellt in der roten Region)

Mit dieser Technik war es möglich, transgene, MOG-bindende B-Zellen in Milz und Lymphknoten von $\text{TCR}^{1640} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Tieren darzustellen. B-Zellen aus TCR^{1640} -Tieren zeigten nur geringfügig mehr MOG-Bindung als solche aus SJL/J-Wt-Tieren. Auch wenn man davon ausgeht, dass die Anzahl der B-Zellen in TCR^{1640} -Tieren, die die MOG-spezifischen Antikörper produzieren, nicht hoch sein muss, ist es mit dieser Technik nicht möglich, eine Aussage über etwaige MOG-bindende B-Zellen in TCR^{1640} -Tieren zu treffen. Wie in obiger Abbildung zu sehen ist, war die Anzahl ZNS-infiltrierender B-Zellen in den TCR^{1640} -Tieren (1535) sogar höher als die von $\text{TCR}^{1640} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Tieren (245). Darüber hinaus war es innerhalb der ZNS-infiltrierenden B-Zellen von $\text{TCR}^{1640} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Tieren nicht möglich, im Unterschied zu Milz und Lymphknoten MOG-bindende B-Zellen darzustellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die ins ZNS infiltrierten B-Zellen von $\text{TCR}^{1640} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Tieren bereits im Plasmazell-Stadium befinden, in welchem keine membranständigen Antikörper mehr exprimiert werden. Eventuell könnte eine intrazelluläre IgG- und MOG-Färbung darüber Aufschluss geben, ob es sich bei den ZNS-infiltrierenden B-Zellen von $\text{TCR}^{1640} \times \text{IgH}^{\text{MOG}}$ -Tieren um transgene MOG-spezifische Zellen handelt oder nicht.

6. *Diskussion*

Autoimmunkrankheiten zählen zweifelsohne zu den größten Herausforderungen der heutigen biomedizinischen Forschung. Bei dieser Art von Erkrankung können die verschiedensten lebenswichtigen Körperorgane, wie der Muskelapparat, das endokrine System oder auch das Zentrale Nervensystem, Ziel der eigenen, fehlgeleiteten Immunantwort sein. In vielen Fällen, wie auch bei der Multiplen Sklerose, sind die krankheitsauslösenden Faktoren bislang noch unbekannt, was demzufolge auch die Therapie dieser Erkrankungen auf die Behandlung der Symptome reduziert. Die Unwissenheit über die Ätiologie zum einen, die begrenzte Zugänglichkeit von Biopsiematerial wie im Fall der Multiplen Sklerose zum anderen verdeutlichen die Bedeutung und Notwendigkeit von Tiermodellen für das Studium dieser Erkrankungen.

Erst kürzlich wurde von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) ein doppelt-transgenes Mausmodell beschrieben, das erstaunlich exakt einzelne Aspekte einer bestimmten Variante der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis Optica, auch Devic-Erkrankung genannt, simuliert. Genau die Hälfte dieser doppelt-transgenen Tiere entwickelte während der ersten drei Lebensmonate spontan eine entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems, eine sogenannte Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Die Krankheit verlief in diesen Tieren progredient ohne Anzeichen einer Remission. Die histologische Analyse der erkrankten Tiere ergab, dass die entzündlichen Läsionen auf das Rückenmark und den optischen Nerv beschränkt waren, restliche Gehirnareale aber unversehrt blieben, weshalb diese Tiere auch OSE- (engl.: opticospinal enzephalomyelitis) oder Devic-Tiere genannt wurden.

Die in unseren Breiten dominierende Variante der Multiplen Sklerose unterscheidet sich grundlegend von der überwiegend im fernöstlichen Raum auftretenden Neuromyelitis Optica- oder Devic-Erkrankung. Die sogenannte „westliche oder kaukasische Variante“ der Multiplen Sklerose zeichnet sich durch den typischen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf aus, wie er in ca. 80% der Patienten auftritt. Dabei folgt auf eine Krankheitsphase eine Zeitspanne der Remission, in der sich die Symptome mehr oder weniger vollständig zurückbilden, bevor es zu einem erneuten Krankheitsrückfall kommt. Die pathologischen Läsionen und demyelinisierenden Plaques sind bei den Patienten mit einer „westlichen Variante“ der Multiplen Sklerose über das gesamte Zentrale Nervensystem verteilt und ursächlich für die variablen, „multiplen“, neurologischen Schäden, die betroffene Personen zu der stark heterogenen Gruppe der Multiple-Sklerose-Patienten zusammenfassen. Gerade weil

diese starke Heterogenität besteht, werden diagnostische Marker, die einen nächsten Krankheitsschub ankündigen bzw. den individuellen Krankheitsverlauf vorhersagen könnten, Gegenstand gegenwärtiger Forschungen bleiben bzw. wird forciert danach gesucht werden. Da es unbestritten sehr erschwert ist, Biopsiematerial eines Multiple-Sklerose-Patienten zu bekommen, bleiben Blut und Knochenmark die einzig verfügbaren Quellen, um Material für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke zu gewinnen. Aus verschiedenen Studien geht dabei hervor, dass Antikörper aus dem Serum und Liquor cerebrospinalis als mögliche diagnostische Marker in Betracht gezogen werden können, zumal eine intrathekale Antikörper-Produktion (der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor cerebrospinalis) sowie eine B-Zell-Dominanz im Zusammenhang mit einem eher progredienten Krankheitsverlauf stehen (Reindl et al., 2006).

Im Folgenden wird nun, die Reihenfolge der Ergebnisse einhaltend, zunächst auf die Herstellung und Charakterisierung der beschriebenen T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäuse eingegangen und anschließend die Relevanz der hier beschriebenen *RR-Maus* als ein neues, spontanes Tiermodell für die „westliche Variante“ der Multiplen Sklerose diskutiert.

6.1 Herstellung MOG-spezifischer T-Zell-Rezeptor-transgener Mäuse

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung von MOG- (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) spezifischen T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen. Das wissenschaftliche Interesse an MOG als Autoantigen basiert, neben seiner Bedeutung in EAE-Tiermodellen und einer möglichen Relevanz MOG-spezifischer Autoantikörper als diagnostische Marker in Multipler Sklerose, nicht zuletzt auf der starken evolutionären Konserviertheit des Proteins. Darüber hinaus gibt es zwei humane Proteine, Butyrophillin und hERMAP (humanes Erythrozytenmembran-assoziertes Protein), die eine starke Sequenzhomologie zum MOG-Protein zeigen und deshalb als mögliche Kandidaten für „Molekulare Mimikry“ in Frage kommen (siehe Abb. 6.1).

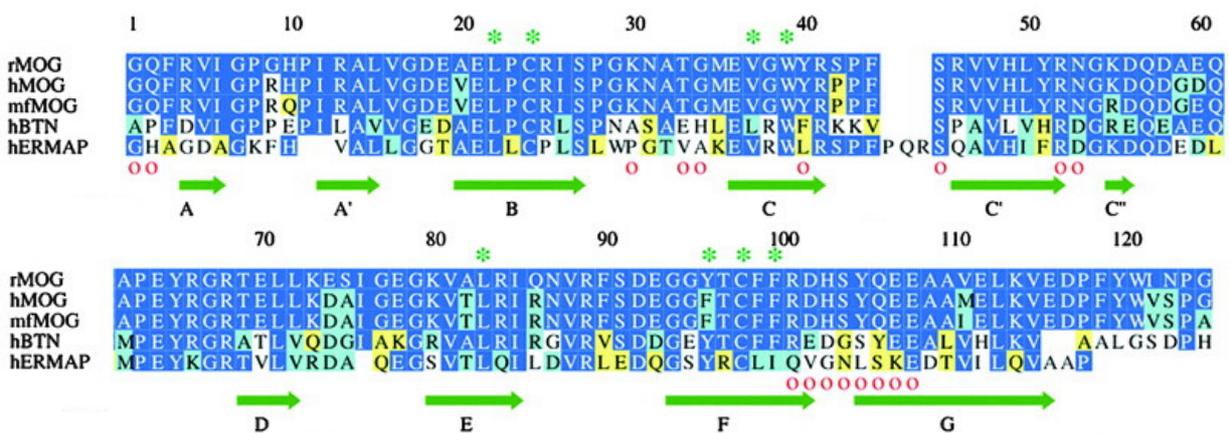


Abb. 6.1:

Sequenzvergleich des MOG-Proteins aus verschiedenen Spezies (entnommen aus Breithaupt et al., 2003). rMOG= MOG aus Ratte; hMOG= humanes MOG, mfMOG= MOG aus *Macaca fascicularis*; hBTN= humanes Butyrophillin; hERMAP= humanes Erythrozytenmembran-assoziertes Protein; konservierte Reste der IgV-ähnlichen Proteine sind mit einem grünem Stern * markiert. Rote Kreise geben die Aminosäurereste aus dem MOG-Protein der Ratte an, die mit dem monoklonalen Antikörper 8.18C5 interagieren.

Als Matrize für die Erzeugung der MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäuse wurde der T_H1 -spezifische $CD4^+$ -T-Zellklon C3 ausgewählt, da der Klon im Proliferationsassay (siehe Abb. 5.1) sowohl spezifisch für die N-Terminale Domäne von MOG, MOG₁₋₁₂₅, war als auch für das MOG₉₂₋₁₀₆-Peptid, das bekanntlich in SJL/J-Tieren (I-A^S) immundominant und enzephalitogen ist (Amor et al., 1994). Darüber hinaus war es möglich, die V α 8.3- und V β 4-Ketten als Bestandteile des T-Zell-Rezeptors zu identifizieren und mit monoklonalen Antikörpern im FACS darzustellen, was die zukünftige Analyse von TZR-transgenen Tieren wesentlich erleichterte (siehe Abb. 5.4).

Bei der Analyse der verschiedenen MOG-spezifischen T-Zellklone (siehe Tab. unter 4.1.2) konnte in 6 der 21 analysierten Klone die V α 8.3- bzw. sogar in 11 Klonen die V β 4-Kette als Bestandteil des T-Zell-Rezeptors identifiziert werden. Solch eine Dominanz von bestimmten V-Regionen, v.a. der V β -Region, in antigenspezifischen T-Zell-Immunantworten ist seit den Arbeiten von Zamvil (1988), Urban (1988) und Acha-Orbea et al. (1988) auf dem Gebiet der MBP- (Mylin Basisches Protein) induzierten EAE in der Maus bekannt. Auf den Resultaten dieser Arbeitsgruppen beruht die sogenannte „V-Region-Hypothese“, die besagt, dass bestimmte V β -Regionen innerhalb des T-Zell-Repertoires ausreichend und notwendig sind, um T-Zell-Immunantworten und EAE in der Maus zu induzieren.

Wie das adoptive Transfer-Experiment mit Zellen des C3-T-Zellklons zeigte, war der *in vitro* erzeugte T_H1-spezifische T-Zellklon *in vivo* stark enzephalitogen (siehe Abb. 5.5). Diese autoreaktiven und pathogenen Fähigkeiten des C3-T-Zellklons verstärkten das Interesse an der Auswahl dieses Klons als Matrize für die Herstellung einer T-Zell-Rezeptor-transgenen Maus. Außerdem verdeutlicht das Experiment, dass der adoptive Transfer reiner T_H1-spezifischer Zellen in den Empfängertieren eine sehr stark ausgeprägte EAE induzieren kann, ohne eine initiale Beteiligung von T_H17-T-Zellen. Dass sich allerdings im Verlauf der T_H1-induzierten EAE T_H17-spezifische T-Zellen ausbilden, ist potentiell möglich (Suryani und Sutton, 2007), wurde im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass seit den Arbeiten mit PLP₁₃₉₋₁₅₁-TZR-transgenen SJL/J-Mäusen (Waldner et al., 2000) oder den von Mendel et al. (2004) erzeugten MOG₃₅₋₅₅-TZR-transgenen C57BL/6-Tieren bekannt war, dass das enzephalitogene Potential des Matrizen-T-Zellklons nicht unbedingt Rückschlüsse zulässt über das Auftreten spontaner EAE in den transgenen Tieren. So war die Inzidenz der spontanen EAE in den von Waldner erzeugten PLP₁₃₉₋₁₅₁-transgenen Tieren sogar in denen, die von einem nicht-enzephalitogenen T-Zellklon abstammten, höher als solche, die TZR-Ketten exprimierten, die aus einem enzephalitogenen T-Zellklon gewonnen worden waren.

Das in dieser Arbeit dargestellte adoptive Transfer-Experiment mit Zellen des C3-T-Zellklons wurde nach der fünfte *in vitro* Restimulation des Klons durchgeführt. Das entsprach dem Zeitpunkt, an dem die RNA des C3-T-Zellklons für die Gewinnung der cDNA-Sequenzen der V α 8.3- und V β 4-Kette präpariert worden war. Auch zu einem späteren Zeitpunkt, der 12. *in vitro* Restimulation, zeigte der C3-T-Zellklon noch enzephalitogenes Potential (Daten nicht gezeigt).

6.2. *TCR¹⁶⁴⁰, TCR¹⁶³⁹ und TCR¹⁵⁸⁶: drei transgene Mauslinien mit unterschiedlicher Penetranz des transgenen T-Zell-Rezeptors*

Drei der erhaltenen TZR-C3-transgenen Linien TCR¹⁶⁴⁰, TCR¹⁶³⁹ und TCR¹⁵⁸⁶ stellten sich als sehr interessant heraus, da ihr T-Zell-Repertoire in unterschiedlichem Ausmaß von der transgenen Expression des C3-T-Zell-Rezeptors betroffen war. Die TCR¹⁶⁴⁰-Linie, auch „High frequency“-Linie genannt, verfügte nahezu ausschließlich über transgene, MOG-spezifische CD4⁺-T-Zellen, wohingegen die TCR¹⁶³⁹-„Medium frequency“- und TCR¹⁵⁸⁶-„Low frequency“-Linie nur zu jeweils 30% bzw. 5% transgene CD4⁺-T-Zellen in ihrem peripheren T-Zell-Repertoire aufwiesen. Wie die Real-time-PCR-Analyse der mRNA im Thymus der drei verschiedenen Linien zeigte, konnte die graduelle Penetranz der transgenen Konstrukte auch auf der Ebene der mRNA-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.13). Welcher Mechanismus dieser unterschiedlichen Penetranz zugrunde lag, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Nach theoretischen Überlegungen müssten alle Zellen eines transgenen Tieres das Konstrukt tragen, Unterschiede in der Expression könnten demnach auf folgenden Faktoren beruhen: Zum einen könnte die Kopienanzahl der integrierten Konstrukte eine Rolle für die Transkriptionseffizienz der transgenen Konstrukte spielen. Zum anderen könnten auch endogene, genetische Elemente wie Enhancer oder Silencer, und damit die Zugänglichkeit des Chromatins, oder auch räumlich und zeitlich limitierte Transkriptionsfaktoren, die in der Entwicklung der T-Zelle eine Rolle spielen, einen Einfluss auf das Expressionsmuster der transgenen Konstrukte ausüben. Studien zur Identifizierung des Integrationsorts sowie der Kopienanzahl der transgenen Konstrukte könnten Aufschluss über die unterschiedliche Expressionspenetranz in den verschiedenen TZR-C3-transgenen Linien geben.

Hinsichtlich der Gesamtzellzahl des *Thymus* unterschied sich nur die TCR¹⁶⁴⁰-Linie von SJL/J-Wt-Tieren: Der Thymus dieser Tiere bestand aus etwa doppelt so vielen Thymozyten wie der einer SJL/J-Wt-Maus (siehe Abb. 5.10). Die FACS-Analyse der Thymozyten aus der TCR¹⁶⁴⁰-Linie zeigte, dass die doppelt-positive CD4⁺CD8⁺-Population überproportional stark vertreten war. In der Anzahl der einfach-positiven CD4⁺- oder CD8⁺-Zellpopulationen bestand in diesen Tieren hingegen kein größerer Unterschied zu SJL/J-Wt-Tieren bzw. es fand sogar eher eine Reduktion dieser Thymozytengruppe statt (siehe Abb. 5.12). Dies könnte auf eine Art negative Selektion der transgenen T-Zellen in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie hindeuten. Ob im Thymus theoretisch eine zentrale Toleranz gegenüber MOG induziert werden kann, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine MOG-Proteinexpression konnte bisher zwar nicht im Thymus

detektiert werden (Mor et al., 1998), MOG-mRNA konnte jedoch in einer Subpopulation von medullären Epithelzellen des Thymus, mTECs, nachgewiesen werden (Derbinski et al., 2001). Im Fall der TCR¹⁶⁴⁰-Linie bleibt unklar, worauf die Deletion der doppelt-positiven Thymozyten beruht, zumal ein großer Anteil der Thymozyten der TCR¹⁶⁴⁰-Linie „ungestört“ zu CD4⁺- oder CD8⁺- einfach-positiven T-Zellen heranreifen konnte und eine starke Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors zeigte, ebenso wie in den anderen beiden Linien. Insofern fand im Thymus der Tiere überwiegend eine normale Entwicklung mit einer positiven Selektion der meisten transgenen T-Zellen statt und keine Induktion von zentraler Toleranz.

Obwohl sich die *Milzgröße* der drei transgenen Linien gegenüber SJL/J-Wt-Tieren nicht signifikant veränderte (siehe Abb. 5.14), war in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie die Anzahl der peripheren CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen deutlich gegenüber SJL/J-Wt-Tieren reduziert (siehe Abb. 5.16). Außerdem war in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie das CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis signifikant auf Seiten der CD4⁺-T-Zellen verlagert, so dass anstelle des 3/1- nun ca. ein 6/1-CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis vorlag (siehe Abb. 5.17). Letzteres konnte bereits in anderen TZR-transgenen Mäusen, wie z.B. in der von Bettelli et al. (2003) erzeugten MOG₃₅₋₅₅-spezifischen TZR-transgenen 2D2-Linie oder den von Goverman et al. (1993) beschriebenen MBPAC₁₋₁₁-TZR-transgenen Tieren, gefunden werden. Berg et al. (1989) beschrieb diese Verlagerung des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnisses in TZR-transgenen Mäusen, die von MHC-II-restringierten CD4⁺-T-Zellklonen abstammten, als Zeichen für eine positive Selektion der CD4⁺-transgenen T-Zellen in diesen Tieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *funktionellen Studien* zeigten, dass die transgenen T-Zellen voll funktionsfähig waren und auf eine antigenspezifische Stimulation mit Proliferation sowie mit der Sekretion von T_H1- und T_H17-Zytokinen reagierten (siehe Abb. 5.18, 5.19 und 5.20). Es war überraschend, dass die TCR¹⁶³⁹-Linie, in der ca. 30% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den transgenen T-Zell-Rezeptor exprimierten, nach Antigenstimulation stärker proliferierten und IL-2 sezernierten als die TCR¹⁶⁴⁰-Linie, in der die meisten T-Zellen den transgenen TZR trugen. Die absolute Anzahl transgener T-Zellen in der Milz dieser beiden Linien war nicht so verschieden, wie die prozentuale Verteilung suggeriert, da die absolute Anzahl der Milz-T-Zellen in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie gegenüber der TCR¹⁶³⁹-Linie reduziert war (siehe nachfolgende Tabelle).

Absolute Anzahl x 10 ⁶ (Milz)	TCR ¹⁶⁴⁰ (n=6)	TCR ¹⁶³⁹ (n=4)	TCR ¹⁵⁸⁶ (n=4)
Vα8.3 ⁺ Vβ4 ⁺ -CD4 ⁺ -T-Zellen	4,68 ± 0,16	3,35 ± 0,1	1,32 ± 0,1
Vα8.3 ⁺ Vβ4 ⁺ -CD8 ⁺ -T-Zellen	0,67 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,48 ± 0,15

Dennoch waren in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie auch zahlenmäßig mehr transgene T-Zellen enthalten als in der TCR¹⁶³⁹-Linie, insofern war dies keine Erklärung für die schwächere Proliferation der TCR¹⁶⁴⁰- gegenüber der TCR¹⁶³⁹-Linie. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die transgenen T-Zellen in den verschiedenen Linien einen unterschiedlichen Aktivitätsstatus aufwiesen. Anhand der Expressionsstärke des T-Zell-Rezeptors konnten in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie innerhalb der transgenen T-Zellen zwei Populationen, TZR^{hoch} und TZR^{niedrig}, voneinander unterschieden werden (siehe Abb. 5.21). Anhand der Expressionsanalyse der Aktivierungsmarker CD62L, CD25, CD69 und CD44 stellte sich heraus, dass in der TZR^{hoch}-Population überwiegend naive, in der TZR^{niedrig}-Population hingegen vor allem aktivierte T-Zellen enthalten waren (siehe Abb. 5.23). Die transgenen T-Zellen der TCR¹⁶⁴⁰-Linie setzten sich zu etwa gleichen Teilen aus TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-T-Zellen und damit sowohl aus naiven als auch aus aktivierten Zellen zusammen. Dagegen bestand die TCR¹⁶³⁹-Linie überwiegend aus T-Zellen der TZR^{hoch}-Population und besaß vor allem naive T-Zellen. Dieser Unterschied im Aktivierungsstatus der transgenen T-Zellen in der TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Linie könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Milzzellen aus der TCR¹⁶³⁹-Linie stärker proliferierten und mehr IL-2 produzierten. Weiterführende Experimente, in denen die T-Zellen der TZR^{hoch}- und TZR^{niedrig}-Population aus TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen getrennt voneinander isoliert und in Proliferation- und Zytokinassays miteinander verglichen werden, könnten weiteren Aufschluss über funktionelle Differenzen zwischen diesen beiden Zellpopulationen geben. Interessanterweise sezernierten stimulierte Milzzellen der TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶³⁹-Linie in etwa gleichen Mengen die Zytokine IFN γ , IL-17 und TNF α (siehe Abb. 5.20). Dieser Befund war insofern relevant, als diese Zytokine, im Unterschied zum Wachstumsfaktor IL-2, eine direkte Rolle in den Effektormechanismen aktivierter T-Zellen spielen könnten. Bislang ist unklar, ob die TZR^{niedrig}-Population von der TZR^{hoch}-Population abstammt, also ob es sich dabei um T-Zellen handelt, die in der Peripherie antigenspezifisch oder -unspezifisch aktiviert worden sind und daraufhin ihren TZR herunter regulieren und einen aktivierten Status annehmen.

Die *Immunisierungsstudien* der TZR-C3-transgenen Linien sollten klären, inwiefern die Anwesenheit der transgenen MOG-spezifischen T-Zellen die Ausbildung von EAE förderte. Immunisiert man SJL/J-Wt-Weibchen mit MOG₁₋₁₂₅ in CFA und Pertussistoxin, tritt in ca.

50% der Tiere durchschnittlich nach ca. $17 \pm 1,4$ Tagen EAE auf. Das gleiche Immunisierungsprotokoll führte in Weibchen der TCR¹⁶⁴⁰-Linie zu einem deutlich beschleunigten Auftreten der EAE ($10,9 \pm 1,4$ Tage nach der Immunisierung), und zudem war die EAE-Induktion viel effizienter (siehe Abb. 5.24). Überraschend war, dass sich Tiere der TCR¹⁶³⁹-Linie mit ca. 30% MOG-spezifischen CD4⁺-T-Zellen nicht anfälliger gegenüber der EAE-Induktion verhielten als SJL/J-Wt-Tiere und TCR¹⁵⁸⁶-Tiere. Dieser Befund ist schwierig zu deuten, da vorangegangene Proliferations- und Zytokinstudien gezeigt haben, dass die transgenen T-Zellen der TCR¹⁶³⁹-Linie an und für sich funktionell waren. Welche Rolle in diesem Zusammenhang die regulatorische CD4⁺-T_{Reg}-Population spielt, ist unklar. Erste Studien zeigten jedoch, dass der Prozentsatz der CD25⁺ FoxP3⁺-T_{Reg}-Zellen innerhalb der CD4⁺-Population (ca. 10%) in den drei transgenen Linien gegenüber SJL/J-Wt-Tieren nicht verändert war (siehe Abb. 5.49).

Dass eine Immunisierung mit MOG₁₋₁₂₅ in CFA/P.tx in Tieren der TCR¹⁶⁴⁰-Linie zur Induktion von EAE führt, war nicht übermäßig überraschend, zieht man in Betracht, dass fast das gesamte T-Zell-Repertoire dieser Tiere aus funktionellen, autoaggressiven Zellen bestand, die durch diese Immunisierung antigenspezifisch aktiviert wurden. Dass in diesen Tieren aber eine Immunisierung mit CFA und Pertussistoxin alleine, ohne MOG, schon ausreichend war, um eine gleich schnelle und gleich starke EAE zu induzieren, war sehr interessant (siehe 5.25). Dies bedeutete, dass eine antigenunspezifische Aktivierung über Komponenten und Rezeptoren des angeborenen und/oder adaptiven Immunsystems genügt, um den autoaggressiven T-Zellen den Weg ins ZNS zu ermöglichen. Möglicherweise spielen in diesem Zusammenhang Rezeptoren der sogenannten TLR- (engl.: TOLL-like rezeptor) Familie eine Rolle, die z.B. durch die Mykobakterien-Komponente des CFA (TLR2) oder über Pertussistoxin (TLR4; Racke et al., 2005) aktiviert worden sein könnten. Weiterführende Experimente werden darüber Aufschluss geben, ob auch eine Immunisierung der TCR¹⁶⁴⁰-Tiere mit entweder CFA oder Pertussistoxin in der Lage ist, in diesen Tieren EAE zu induzieren. In diesem Zusammenhang sind die von Goverman et al. (1993) erzeugten MBP-TZR-transgenen Mäusen und die von Bettelli et al. (2003) erzeugten MOG-TZR-transgenen C57BL/6-Tiere zu erwähnen, in denen bereits eine Immunisierung mit Pertussistoxin ausreichend war, um EAE zu induzieren.

6.3. Spontane EAE in TZR-C3-transgenen Tieren

6.3.1 Inzidenz der spontanen EAE

Wie oben beschrieben, verfügen die drei TZR-C3-transgenen Mauslinien TCR¹⁶⁴⁰, TCR¹⁶³⁹ und TCR¹⁵⁸⁶ über funktionelle, MOG-spezifische T-Zellen, die nach antigenspezifischer Aktivierung T_H1- und T_H17-spezifische Zytokine sezernieren. Da das MOG-Protein ein natürlicher Bestandteil der Myelinscheide ist, tragen die drei Mauslinien somit in unterschiedlicher Frequenz autoaggressive T-Zellen in ihrem T-Zell-Repertoire, die so lange „ungefährlich“ sind, wie der immunprivilegierte Status von MOG als ZNS-restringiertes Protein aufrechterhalten wird. Ein wesentlicher Bestandteil in der Charakterisierung der transgenen Linien war deshalb, Tiere aus jeder Linie für einen definierten Zeitraum hinsichtlich der Ausbildung von EAE zu beobachten. Es stellte sich heraus, dass in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie nahezu alle Weibchen und ca. ¾ der Männchen nach drei bis vier Lebensmonaten spontan eine Autoimmune Enzephalomyelitis ausbildeten. Dies war ein deutlicher Unterschied zu den von Bettelli et al. (2003) und Mendel et al. (2004) erzeugten MOG-spezifischen TZR-transgenen Mäusen in C57BL/6, in denen nur in ca. 4% bzw. gar keine spontane EAE beobachtet werden konnte. Dass weibliche SJL/J-Tiere generell EAE-anfälliger sind als männliche, ist seit längerem bekannt und könnte mit der Prädisposition männlicher Tiere auf einen autoantigenen Stimulus hin, eher immunsupprimierende T_H2- als autoaggressive T_H1-Zellen auszubilden, in Zusammenhang stehen (Cua et al., 1995).

Außer dem Geschlecht könnte auch der *genetische Hintergrund* der Tiere eine wesentliche Rolle spielen und sowohl verschiedene Allele des MHC-Genkomplexes als auch MHC-unabhängige Loci könnten zur EAE-Anfälligkeit der einzelnen Mausstämme beitragen. Dass der MHC-Lokus selbst für die Prädisposition zur spontanen EAE nur eine eher untergeordnete Rolle spielt, konnte im Rahmen vorliegender Arbeit durch Kreuzen der TCR¹⁶⁴⁰-Linie auf den SJL/J- und B10.S-Stamm gezeigt werden. B10.S-Mäuse sind, mit Ausnahme des MHC-Genkomplexes, Tiere mit einem C57BL/10SnSg-Hintergrund, die durch wiederholtes Kreuzen (>10x) von A.SW/Sn-Tieren (H-2^S) auf den C57BL/10SnSg-Stamm unter Fixierung des H-2^S-Haplotyps erzeugt worden waren (<http://jaxmice.jax.org>; #001953). Während die Mehrzahl der TCR¹⁶⁴⁰-Tiere auf dem SJL/J-Stamm spontane EAE entwickelte, trat in den TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren nur in einem von insgesamt 39 Tieren spontane EAE auf. Studien mit T-Zellen aus TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren zeigten, dass der transgene TZR auch in diesem Stamm funktionell war, interessanterweise unterschied sich aber das Expressionsprofil des transgenen T-Zell-Rezeptors abhängig davon, ob der TCR¹⁶⁴⁰-Founder auf den SJL/J- oder den B10.S-

Stamm zurückgekreuzt worden war (siehe Abb. 5.28). TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tiere hatten eine wesentlich geringere Frequenz transgener T-Zellen in ihrem Repertoire und ähnelten eher TCR¹⁶³⁹-Tieren, in denen interessanterweise auch kaum spontane EAE beobachtet werden konnte. Es wird interessant sein zu erfahren, ob und wie sich das Expressionsmuster des transgenen TZR in TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren verändert, wenn diese Linie auf den Rag2^{-/-}-Hintergrund gekreuzt sind. Auch die von Waldner et al. (2000) erzeugte PLP₁₃₉₋₁₅₁-TZR-transgene Founderlinie 5B6, die auf dem SJL/J-Stamm in ca. 40% der Tiere zu spontaner EAE geführt hatte, wurde auf den B10.S-Hintergrund zurückgekreuzt und zeigte dort kaum (4%) spontane EAE. Im Unterschied zu den hier beschriebenen TCR¹⁶⁴⁰-SJL/J- und TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren gab es bezüglich der Expressionsfrequenz des transgenen TZR keinen Unterschied zwischen 5B6-SJL/J- und 5B6-B10.S-Tieren. In beiden Fällen exprimierten ca. 90% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den transgenen T-Zell-Rezeptor, bestehend aus der V α 4- und V β 6-Kette (Waldner et al., 2004).

In der TCR¹⁶³⁹-Linie, in welcher ca. 30% der peripheren CD4⁺-T-Zellen den transgenen MOG-spezifischen TZR trugen, konnte zu keiner Zeit spontane EAE beobachtet werden. Interessanterweise traten jedoch einige Fälle spontaner EAE in der TCR¹⁵⁸⁶-Linie auf, obwohl in diesen Mäusen nur etwa 5% MOG-spezifische periphere T-Zellen vorhanden waren. Es bleibt nach wie vor ungelöst, warum sich die TCR¹⁶³⁹-Linie resistent gegenüber dem Auftreten spontaner EAE verhielt. Erste Studien, in denen in TCR¹⁶³⁹-Tieren die regulatorische CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-T-Zell-Population T_{Regs} mit α -CD25- (PC61) sowie α -GITR-Antikörpern (engl.: glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene; DTA-1) für mehrere Wochen erfolgreich depletiert worden waren, führten nicht zu einem Auftreten spontaner EAE. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in einem Depletionsexperiment, in dem α -CD25-Antikörper verwendet werden, außer den regulatorischen CD25⁺FoxP3⁺-T_{Reg}-Zellen auch die potentiell autoaggressiven CD25⁺CD4⁺-Effektor-T-Zellen entfernt werden und somit auch die möglichen Verursacher der spontanen EAE nicht mehr vorhanden sind. Nicht zuletzt wird in der TCR¹⁶³⁹-Linie die Identifizierung des Integrationsorts des transgenen TZR darüber Aufschluss geben, ob nicht durch die zufällige Insertion des transgenen Konstruktes ein für die Ausbildung von EAE wichtiger Genlocus betroffen wurde.

Die von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) beschriebenen *doppelt-transgenen* TCR^{MOG} \times IgH^{MOG}-C57BL/6-Tiere trugen neben einem MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor (2D2) zusätzlich ein „Knock-In“-Konstrukt für die schwere Kette des pathogenen MOG-spezifischen Antikörpers 8.18C5. In 50% dieser doppelt-transgenen Devic-Tiere

konnte spontane EAE beobachtet werden, in einfach-transgenen TCR^{MOG}-(2D2)- oder IgH^{MOG}-C57BL/6-Tieren jedoch nicht. Überraschenderweise, und im klaren Unterschied zu den Devic-Tieren in C57BL/6, kam es nach Verpaaren der drei verschiedenen TZR-C3-transgenen Linien, TCR¹⁶⁴⁰, TCR¹⁶³⁹ und TCR¹⁵⁸⁶, mit IgH^{MOG}-Tieren nicht zu einem Anstieg in der Inzidenz der spontanen EAE (vergleiche Tab. 5.26 mit 5.29). Auch in doppelt-transgenen TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-B10.S-Tieren, die bis auf den transgenen T-Zell-Rezeptor eine starke Annäherung an die Devic-Mäuse von Krishnamoorthy und Bettelli waren, konnte kein verstärktes Auftreten spontaner EAE gegenüber einfach transgenen TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren beobachtet werden. Im Unterschied zu C57BL/6- hatte demnach weder in SJL/J- noch in B10.S-Tieren die Anwesenheit transgener MOG-spezifischer B-Zellen und Antikörper (die IgH^{MOG}-Komponente) einen Effekt auf die Ausbildung der spontanen EAE.

6.3.2 Verlauf der spontanen EAE

Der Verlauf der spontanen EAE in den erkrankten Tieren wurde in die drei Kategorien progredienter Verlauf, schubförmig-remittierender Verlauf mit kompletter und schubförmig-remittierender Verlauf mit partieller Remission eingeteilt. In einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit kompletter Remission wurde zudem unterschieden, ob es sich bei den ersten Krankheitsanzeichen um eine leichte paralytische, klassische EAE oder um eine von Ataxie geprägte Krankheitsphase handelte. An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine vollständige Remission generell nur in solchen Tieren auftrat, deren erster Schub aus diesen „leichteren“ Erkrankungsphasen bestand. Außerdem traten diese leichten Erkrankungsphasen in den beobachteten Tieren meist auch immer nur einmal auf, bevor es zum Auftreten von starken Lähmungserscheinungen kam. Der Name *RR-Maus* von „Relapsing-Remitting“ (engl. für schubförmig-remittierender Krankheitsverlauf) ist also für diese Tiere zutreffend, obwohl es unter den verschiedenen Verlaufsformen der Multiple Sklerose des Menschen Varianten gibt, in denen mehrere Krankheitsschübe auftreten, die sich alle wieder vollständig zurückbilden.

Das Auftreten von *Ataxie* als eine sogenannte nichtklassische EAE-Variante war in den spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren relativ häufig und konnte histologisch mit zellulären Infiltraten und dem Auftreten von Demyelinisierung im Cerebellum und der Medulla oblongata unterlegt werden. Arbeiten von der Gruppe um Juan Lafaille haben gezeigt, dass MBP-spezifische T-Zellen, die *in vitro* zu T_H2-Zellen mit einer starken IL-5-Produktion polarisiert worden waren (IL-4; α -IFN γ -Antikörper), in adoptiven Transfer-Experimenten

meist eine nichtklassische, von Ataxie geprägte EAE in den Empfängertieren induzierten (Wensky et al., 2005). Auch in diesen experimentell induzierten Tieren mit einem ataxischen Krankheitsbild konnten die Entzündungsherde überwiegend im Cerebellum und in der Medulla oblongata gefunden werden.

In den analysierten TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-SJL/J-Tieren und bei den wenigen TCR¹⁵⁸⁶-Tieren trat die spontane EAE in den Weibchen meist in einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit überwiegend kompletter Remission zwischen dem ersten Krankheitsschub und einem anschließenden ersten Rückfall auf (siehe Tab. 5.34). Bei den Männchen kam es zu etwa gleichen Teilen zu einem progredienten bzw. einem schubförmig-remittierenden Verlauf. In MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Weibchen, die als Kontrolle für den bekanntlich schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf in SJL/J-Tieren mitgeführt wurden, verlief die EAE überwiegend in einem schubförmig-remittierenden Verlauf mit partieller Remission.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten einer schubförmig-remittierenden Erkrankung, also einer erneuten Krankheitsphase nach einer symptomfreien Periode, könnte im sogenannten „*Epitope Spreading*“ liegen. Im Bereich der EAE versteht man unter „*Epitope Spreading*“ eine zweite bzw. dritte oder vierte Welle an neu gebildeten autoaggressiven T-Zellen, die spezifisch für ein anderes Epitop sind (intramolekular oder intermolekular) als das, welches die EAE ursprünglich hervorgerufen hat. Von McRae und Vanderlugt (1995) stammen die ersten Hinweise darauf, dass der schubförmig-remittierende Verlauf der EAE in SJL/J-Tieren einen „funktionellen Beweis für *Epitope Spreading*“ darstellen könnte. Darüber hinaus zeigten Studien, in denen Toleranz für ein bestimmtes „*spreading*“-Epitop induziert wurde, dass keine Reaktivität gegenüber dem „*spreading*“-Epitop mehr auftrat und außerdem ein Krankheitsrückfall ausblieb, was vermuten ließ, dass für einen schubförmig-remittierenden Verlauf T-Zellen nötig sind, die für das „*spreading*“ Epitop spezifisch sind (Cross et al., 1993; McRae et al., 1995 und Vanderlugt et al., 2000). Allerdings konnte „*Epitope Spreading*“ auch im fortgeschrittenen, progredienten Krankheitsverlauf von immunisierten SWXJ-F₁-Tieren beobachtet werden. Insofern wäre es möglich, dass es zwischen „*Epitope Spreading*“ und dem Voranschreiten der EAE auch nur eine zeitliche Korrelation gibt (Yu et al., 1996; Tuohy et al., 1999). Auch aus den von Jones et al. (2003) durchgeführten Studien mit transgenen Mäusen, die nur noch eine T-Zell-Rezeptor-Spezifität aufwiesen (transgenic/SCID+/+), ging hervor, dass sich auch ohne die Möglichkeit, Immun-Reaktivitäten gegenüber weiteren Epitopen auszubilden, ein schubförmig-remittierender Krankheitsverlauf in den Tieren entwickeln kann.

Um zu überprüfen, ob in den hier beschriebenen MOG-spezifischen TZR-C3-transgenen Tieren T-Zell-Immunantworten gegen weitere Antigene überhaupt möglich waren, wurden die Tiere mit dem immunologisch irrelevanten Antigen Ovalbumin immunisiert. Erstaunlicherweise konnten in den MOG-spezifischen TZR transgenen Mäusen, TCR¹⁶⁴⁰ und TCR¹⁶³⁹, Ovalbumin-spezifische T-Zelllinien erzeugt werden (siehe Abb. 5.35), wobei auf Kosten der transgenen V α 8.3- und V β 4-Ketten vermehrt neue V α - und zum Teil auch neue V β -Ketten (Linie TCR¹⁶³⁹) in den TZR verwendet wurden (Abb. 5.36 und 5.37). Da auch in der TCR¹⁶⁴⁰-Linie T-Zell-Reaktivitäten gegenüber Ovalbumin induziert werden konnten, besteht in diesen Tieren grundsätzlich die Möglichkeit weiterer T-Zell-Immunantworten, insofern kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass in den spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren „Epitope Spreading“ auftritt und so möglicherweise zum schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf beiträgt. Eventuell kann durch das Verpaaren der TCR¹⁶⁴⁰-Mäuse auf einen RAG^{-/-}-Hintergrund, in dem die Rekombination der Gene für die endogenen TZR-Ketten defekt ist (ähnlich Jones et al., 2003), geklärt werden, ob ein schubförmig-remittierender Krankheitsverlauf in den TCR¹⁶⁴⁰-Tieren von der Anwesenheit weiterer TZR-Spezifitäten und damit möglicherweise „Epitope Spreading“ abhängig ist oder nicht.

6.3.3 Pathophysiologie der spontanen EAE

Die histologische Analyse von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zeigte, dass in diesen Mäusen außer Rückenmark und optischen Nerven auch verschiedenste Gehirnareale von den zellulären Infiltrationen und Entmarkungsvorgängen betroffen waren, im Unterschied zu den kürzlich beschriebenen C57BL/6-Devis-Mäusen (Krishnamoorthy et al., 2006, Bettelli et al., 2006). Zu den betroffenen ZNS-Arealen von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zählten die Medulla oblongata, das Mesencephalon, periventrikuläre Bereiche sowie Areale entlang der Meningen. Vor allem in Tieren mit ataxischen Krankheitsanzeichen war das Cerebellum Ziel weitreichender Demyelinisierungen und axonaler Schädigungen. Letzteres war insofern interessant, als in SJL/J-Tieren das Cerebellum, neben dem Rückenmark, zu den Regionen des ZNS zählt, die als besonders anfällig für einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke gelten (Tonra, 2002). Zu den Faktoren, die zu Schäden an der Blut-Hirn-Schranke und damit zur EAE-Anfälligkeit der SJL/J-Tiere beitragen können, zählt, gemäß Tonra et al. (2002), das Vorhandensein von Blutgefäßen, vor allem von Venen, die weit verzweigt in die Myelinhaltige weiße Substanz des Gehirns hineinragen und so Leukozyten und Plasmaproteinen den Weg aus dem Blut in diese Areale ermöglichen.

Außerdem zeigte die histologische Analyse, dass es zwischen kranken TCR¹⁶⁴⁰- und TCR¹⁶⁴⁰ x IgH^{MOG}-Tieren weder im Ausmaß der Infiltration (Infiltrate/mm²) und Demyelinisierung noch in der Zusammensetzung und anatomischen Lokalisation der Läsionen einen Unterschied gab (siehe Tab. 5.38). Bei der histologischen Analyse von chronisch kranken Tieren, die über mehrere Wochen klinische Anzeichen von EAE gezeigt hatten, stellte sich heraus, dass die Anzahl der infiltrierenden Zellen deutlich zurückgegangen war und außerdem die Remyelinisierung der betroffenen Organe eingesetzt hatte (siehe Abb. 5.41). Sowohl die variable Lokalisation der Läsionen als auch das Auftreten von Remyelinisierung waren der Situation in MS-Patienten sehr ähnlich (Lucchinetti et al., 2000).

Zu den ins zentrale Nervensystem von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren infiltrierten Lymphozyten zählten neben CD11b⁺-Makrophagen, CD4⁺-T-Zellen und einigen CD8⁺-T-Zellen auch interessanterweise eine relativ hohe Anzahl CD19⁺-B-Zellen (siehe Abb. 5.42).

Wie aus der Literatur hervorgeht, treten in den autoimmunen Entzündungsreaktionen im ZNS zumeist sowohl CD4⁺-T_H1- (IFN γ -produzierend) als auch CD4⁺-T_H17-Effektorzellen auf, wobei die T_H17-Zellen aber sowohl zahlenmäßig als auch hinsichtlich ihres pathogenen Effekts eine größere Rolle zu spielen scheinen (Hofstetter et al., 2007; Cua et al., 2003). Mit Hilfe intrazellulärer Färbungen der Zytokine IFN γ und IL-17 konnten diese beiden CD4⁺-T_H-Zellpopulationen im ZNS der spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tiere dargestellt werden. Es stellte sich heraus, dass sich in den EAE-Läsionen zu gleichen Mengen sowohl T_H1- (IFN γ -produzierend) als auch T_H17-Effektorzellen (IL-17-produzierend) befanden (siehe Abb. 5.44 und 5.45). Weiterführende Studien, in denen die TCR¹⁶⁴⁰-Tiere mit IL-23- und IL-12-Knock-out-Tieren, in denen entweder die IL-17- oder IFN γ -produzierende Zellpopulation fehlt, verpaart werden, könnten darüber Aufschluss geben, welche der beiden CD4⁺-T_H-Populationen für die Ausbildung der spontanen EAE in TCR¹⁶⁴⁰-Tieren wichtiger ist.

Die Real-time-PCR-Analyse der Expression verschiedener Zytokine im ZNS zeigte, dass in Läsionen von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren und MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Tieren ein ähnliches Zytokinprofil nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 5.47). In beiden Fällen dominierten die T_H1-Zytokine IFN γ , TNF α und IL-2, und es konnte außerdem die mRNA des Chemokins IP-10, auch CXCL10 genannt, nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es auch mit dieser Technik möglich, eine Beteiligung von IL-17-produzierenden Zellen an der spontanen EAE zu zeigen. Interessanterweise konnte außerdem die mRNA der T_H2-spezifischen Zytokine IL-10 und IL-5 im ZNS der erkrankten Tiere detektiert werden. Die Tatsache, dass im ZNS von erkrankten Tieren IL-5 detektiert werden konnte, war insofern interessant, als murines IL-5, das auch BCDF (engl.: B-cell differentiation factor) genannt

wird, im Unterschied zu humanem IL-5 auf B-Zellen wirkt und in der Lage ist, die Proliferation von prä-aktivierten B-Zellen zu induzieren und ihre Differenzierung zu stimulieren (Sanderson et al., 1988).

Für die hier durchgeführte Real-time-PCR-Analyse wurde jeweils das gesamte Rückenmark der einzelnen Tiere verwendet, demzufolge ist die Nachweisgrenze einzelner inflammatorischer Moleküle deutlich höher als in einer FACS-Analyse von ZNS-isolierten Lymphozyten. Mittels Real-time-PCR-Analyse konnte demnach in gesunden TCR¹⁶⁴⁰-Tieren keine mRNA-Expression von IFN γ und IL-17 nachgewiesen werden, mit der intrazellulären Zytokinfärbung ZNS-isolierter Lymphozyten aber schon (siehe Abb.5.45).

6.4 Rolle der B-Zellen und Autoantikörper in der spontanen EAE von TCR^{1640} -Tieren

In den von Krishnamoorthy et al. (2006) und Bettelli et al. (2006) beschriebenen Devic-Tieren konnte in verschiedenen Versuchsansätzen eine verstärkte wechselseitige antigenspezifische T-B-Zell-Interaktion gefunden werden. Dies war eine mögliche Erklärung dafür, dass die spontane EAE nur in den doppelt-transgenen Tieren auftrat, weil nur in diesen Tieren sowohl MOG-spezifische T- als auch B-Zellen vorhanden waren. Im deutlichen Unterschied zum Devic-Modell gab es in SJL/J-Tieren hinsichtlich Inzidenz, Histologie und Krankheitsverlauf aber keinen signifikanten Unterschied zwischen einfach- und doppelt-transgenen Tieren. Das war umso interessanter, als es auch auf dem SJL/J-Hintergrund zum Zusammenspiel der transgenen IgH^{MOG} -B-Zellen mit den transgenen TCR^{1640} -T-Zellen kam, wie die präferentielle Antigenpräsentation des MOG₁₋₁₂₅-Proteins und der $IgG1^a$ -Isotyp-Wechsel der transgenen MOG-spezifischen Antikörper in den doppelt-transgenen Tieren zeigen (siehe Abb. 5.51 bis 5.53).

Überraschenderweise spielen *B-Zellen* sowie die von ihnen sezernierten Antikörper bereits in der einfach-transgenen *RR-Maus* eine besondere Rolle. Erste Hinweise darauf stammen aus der Analyse der ZNS-infiltrierenden Lymphozyten aus den spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren, da sich ein sehr hoher Anteil B-Zellen (10 bis 30%) darunter befand, mitunter sogar mehr als innerhalb der ZNS-infiltrierenden Lymphozyten von doppelt-transgenen $TCR^{1640} \times IgH^{MOG}$ -Tieren (siehe Abb. 5.62). Darüber hinaus fand sowohl in einfach- wie in doppelt-transgenen spontan erkrankten Tieren eine massive Demyelinisierung statt. Letztere steht, in Mausmodellen wie in Multiple-Sklerose-Patienten, oft in Zusammenhang mit Antikörper-vermittelten Abbauprozessen (Läsionen der 2. Kategorie, der Antikörper-vermittelten Demyelinisierung nach Lucchinetti et al., 2003). Am interessantesten war jedoch der Nachweis von gebundenen Immunglobulinen in ZNS-Läsionen von spontan erkrankten TCR^{1640} -Tieren (siehe Abb. 5.54). Dies ließ vermuten, dass hier möglicherweise myelinspezifische Autoantikörper aus dem endogenen B-Zell-Repertoire der Tiere eine Rolle spielen.

Daraufhin wurde das Serum von TCR^{1640} -Tieren auf Anwesenheit von Autoantikörpern mittels ELISA überprüft, ähnlich wie auch der Nachweis von autoreaktiven MOG- und MBP-spezifischen Antikörpern aus dem Serum von Multiple-Sklerose-Patienten durchgeführt wird. Da erst kürzlich von Peterson et al. (2006) im Serum von MOG-immunisierten Mäusen polyreaktive Antikörper, die auch an genomische DNA binden können, identifiziert worden

waren, wurde der Assay auf den Nachweis von MOG-, MBP- und DNA-bindenden Antikörpern ausgeweitet (siehe Abb. 5.56). Es stellte sich heraus, dass sich im Serum von 8-10 Wochen alten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, unabhängig vom Krankheitsstatus, MOG₁₋₁₂₅-spezifische Antikörper nachweisen ließen, aber weder MBP- noch DNA-bindende Immunglobuline zu finden waren. Es war demnach möglich, im Serum von spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, analog zu MS-Patienten, MOG-bindende Antikörper nachzuweisen. Dass diese bereits in gesunden 8-10 Wochen alten TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen zu finden waren, könnte mit den subklinischen Entzündungsprozessen in Zusammenhang stehen, die bereits in (noch) gesunden Tieren histologisch nachweisbar waren (siehe Abb. 5.46). Diese subklinischen Entzündungsprozesse scheinen demnach ausreichend, um mit Hilfe der transgenen T-Zellen die Aktivierung von MOG-spezifischen B-Zellen und die daraus resultierende Produktion von MOG-spezifischen Immunglobulinen zu induzieren.

In Studien mit einem Panel aus je 20 Aminosäuren langen MOG-Peptiden, die die gesamte extrazelluläre Domäne des MOG₁₋₁₂₅-Proteins abdecken, sollte versucht werden, Epitope dieser MOG-spezifischen Antikörper aus dem Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren zu identifizieren, was allerdings in ersten Versuchsansätzen nicht gelang und weiterer Studien bedarf. Es könnte allerdings sein, dass die MOG-spezifischen Antikörper im Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, ähnlich dem demyelinisierenden 8.18C5-Antikörper, dessen schwere Kette in den IgH^{MOG}-Tieren exprimiert wird, ein konformationelles Epitop von MOG erkennt (Breithaupt et al., 2003). Da MOG *in vivo* sowohl glykosyliert vorliegt als auch starke Sekundärstrukturen wie eine über Disulfidbrücken gebildete immunglobulinartige Domäne aufweist (Johns und Bernard, 1999), war es für das Verständnis einer möglichen pathologischen Relevanz dieser MOG-spezifischen Antikörper in den TCR¹⁶⁴⁰-Tieren entscheidend, dass diese in der Lage waren, natives MOG-Protein auf der Oberfläche von EL4-Zellen zu binden (siehe Abb. 5.60). Um Titer und Isotypverteilung der MOG-spezifischen Antikörper aus TCR¹⁶⁴⁰-Tieren in den Kontext der klassischen, induzierten MOG-EAE zu setzen, wurden die TCR¹⁶⁴⁰-Seren mit solchen von MOG₁₋₁₂₅-immunisierten SJL/J-Wt-Tieren verglichen. Es war erstaunlich, dass in beiden Fällen die Antikörper-Titer etwa gleich hoch waren, d.h., dass sich spontan ähnliche Mengen dieser Immunglobuline gebildet hatten wie nach einer aktiven Immunisierung. Auch hinsichtlich der Verteilung der untersuchten Antikörper-Isotypen bestand zwischen den durch Immunisierung erzeugten und spontan auftretenden MOG-spezifischen Antikörpern kein Unterschied. In beiden Fällen konnten MOG-spezifische Antikörper vom Isotyp IgG1, IgG2a und IgG2b identifiziert werden (siehe Abb. 5.57).

Der direkte Zusammenhang zwischen der Anwesenheit dieser Immunglobuline und dem Auftreten von spontaner EAE konnte erst bei der Analyse von Serum aus den TCR¹⁶³⁹-, gesunden TCR¹⁵⁸⁶- sowie spontan erkrankten TCR¹⁵⁸⁶-Tieren identifiziert werden: Es zeigte sich, dass außer den Seren von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren (unabhängig vom Krankheitszustand) nur solche von spontan erkrankten TCR¹⁵⁸⁶-Tieren MOG-spezifische Antikörper enthielten, diese aber weder in gesunden TCR¹⁵⁸⁶- noch in den EAE-resistenten TCR¹⁶³⁹- und TCR¹⁶⁴⁰-B10.S-Tieren nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 5.59). Darüber hinaus verdeutlicht die Tatsache, dass im Serum von MOG-defizienten TCR¹⁶⁴⁰-MOG^{-/-}-Tieren (n=3; Alter 10 Wochen) keine MOG-spezifischen Antikörper gefunden werden konnten, dass diese auf einer MOG-Exposition oder -Freisetzung und nicht auf Kreuzreaktivität beruhen. Dies ließ vermuten, dass es durch eine (sub-)klinische Entzündungsreaktion im ZNS zur *de novo* Bildung von MOG-spezifischen Antikörpern kommen kann. Abschließend gilt es zu erwähnen, dass bisher noch in keinem weiteren TZR-transgenen EAE-Modell eine *de novo* Synthese autoreaktiver Antikörper beschrieben wurde, und zwar weder in den von Waldner et al. (1999) erzeugten PLP₁₃₉₋₁₅₁-TZR-transgenen SJL/J- noch in den MOG₃₅₋₅₅-TZR- oder MBP-TZR-transgenen Tieren (Bettelli et al. (2003); Goverman et al., 1993). In anderen TZR-transgenen Autoimmun-Modellen ist solch eine spontane Ausbildung von Autoantikörpern aber bereits beschrieben worden. So zum Beispiel in der bekannten K/BxN-Maus aus dem Labor von Diane Mathis und Claude Benoist (Kouskoff et al., 1996): In dieser TZR-transgenen Maus auf dem NOD-Hintergrund tritt spontan eine der Rheumatoiden Arthritis ähnliche Erkrankung auf, wobei pathogene Autoantikörper gegen das Enzym Glukose-6-Phosphate-Isomerase gebildet werden (Matsumoto et al., 1999).

Offen bleiben viele Frage, darunter die, „wo die Aktivierung der MOG-spezifischen B-Zellen stattfindet“, d.h., ob MOG aus dem ZNS in die peripheren Lymphgewebe gelangt und es dort mit Hilfe der transgenen T-Zellen zur B-Zell-Aktivierung kommt oder ob dies vielleicht im ZNS selbst geschieht. Ein möglicher Hinweis auf eine antigenspezifische Aktivierung peripherer Lymphozyten könnte im prozentualen Anstieg der CD4⁺-T-Zellen, vor allem der naiven TZR^{hoch}-T-Zellpopulation, in Lymphknoten und Milz der erkrankten Tiere zu finden sein (siehe Abb. 5.50). Bisher ist es nicht gelungen, mittels FACS MOG-bindende B-Zellen im ZNS oder in den peripheren Lymphgeweben von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren direkt darzustellen (siehe Abb. 5.62). Interessant war allerdings, dass in der gesamten B-Zellpopulation von TCR¹⁶⁴⁰-Tieren, unabhängig vom Krankheitsstatus, im Vergleich zu SJL/J-Wt-Mäusen ein erhöhter Aktivitätsstatus festgestellt werden konnte, der sich unter anderem durch eine erhöhte MHC-Klasse-II- und B7.1-Expression in den Lymphgeweben dieser Tiere manifestierte (Daten nicht

gezeigt). Außerdem konnte in den spontan erkrankten TCR¹⁶⁴⁰-Tieren ein signifikanter Anstieg im absoluten Titer von IgM-, IgG2a-, IgG2b- und IgG3-Immunglobulinen gegenüber gesunden TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen festgestellt werden (siehe Abb. 5.55). Bislang ist ungeklärt, ob es sich bei den MOG-spezifischen Antikörpern um eine Ursache oder eine Folge der spontanen EAE handelt. Experimente, in denen Serum von TCR¹⁶⁴⁰-Mäusen in subklinisch immunisierte Tiere appliziert wird, werden möglicherweise darüber Aufschluss geben, ob diese Antikörper zum pathologischen Prozess beitragen können oder nicht.

6.5 Vergleich der *RR-Maus* mit *Multiple-Sklerose-Patienten*

Die in dieser Arbeit erzeugte *RR-Maus* spiegelt viele Aspekte der humanen Multiplen Sklerose wider und eignet sich außerdem aufgrund der hohen Inzidenz der spontanen EAE gut für die Evaluierung therapeutischer Substanzen. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *Multiple-Sklerose-Patienten* und der *RR-Maus*.

Merkmal	Multiple Sklerose	<i>RR-Maus</i>
Entstehung der neurologischen Schäden	Abrupt 80% schubförmig-remittierend	Abrupt 70% (w) schubförmig-remittierend 35% (m) schubförmig-remittierend
Höchste Risikogruppe	Junge Erwachsene (w)/(m): 1,6 /1	Junge erwachsene Mäuse (3-4 Mon.) (w)/(m): 1,2/1
Lokalisation der Läsionen	Variabel mit den versch. Schüben <ul style="list-style-type: none"> • Cerebellum • Periventrikulär • Medulla oblongata • Kortikaler Mantel • Oberes Rückenmark • Optische Nerven 	Variabel mit den versch. Schüben <ul style="list-style-type: none"> • Cerebellum • Periventrikulär • Medulla oblongata • Rückenmark • Optische Nerven • Meningen
De- & Remyelinisierung	<ul style="list-style-type: none"> • Starke Demyelinisierung in den Läsionen • Remyelinisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Starke Demyelinisierung in den Läsionen • Teils Remyelinisierung
Schädigung der Axone	+	+
Zelluläre Zusammensetzung der Läsionen	<ul style="list-style-type: none"> • CD4⁺-T-Zellen • Viele CD8⁺-T-Zellen • B- und Plasmazellen • MΦ, aktivierte Mikroglia • γδ-T-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • CD4⁺-T-Zellen • Wenig CD8⁺-T-Zellen • B- und Plasmazellen • MΦ, aktivierte Mikroglia
Humorale Komponente	<ul style="list-style-type: none"> • Immunglobulin • Komplement C9neo • Plasmapherese positiv → Pattern II (Lucchinetti et al., 2003)	<ul style="list-style-type: none"> • Immunglobulin • Komplement (gering) → ähnlich Pattern II
αMOG- und αMBP Antikörper im Serum	α-MOG- und α-MBP-Antikörper im Serum, aber als diagnostischer Marker umstritten	α-MOG-, aber keine α-MBP Antikörper im Serum

Trotz der oben aufgeführten Ähnlichkeiten der *RR-Maus* zu *Multiple-Sklerose-Patienten* muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass in der TCR¹⁶⁴⁰-Maus nahezu das gesamte T-Zell-

Repertoire modifiziert ist und so, obwohl noch MOG-unabhängige Immunantworten erzeugt werden können, stark artifiziell ist. Im Unterschied dazu ist in der TCR¹⁵⁸⁶-Linie das T-Zell-Repertoire weitgehend unverändert, und es kommt trotzdem in einigen Fällen zum Auftreten spontaner EAE sowie zur Ausbildung von krankheitsabhängigen, MOG-spezifischen Antikörpern. Insofern spiegelt die TCR¹⁵⁸⁶-Linie eher die humane Situation wider, in der wahrscheinlich eine kleine Anzahl Myelin-spezifischer oder kreuzreaktiver T-Zellen unter bestimmten Bedingungen Entzündungsprozesse im ZNS einleitet, die unter der Ausbildung von MOG-spezifischen Autoantikörpern zur Entmarkung der betroffenen ZNS-Areale und damit zu den neurologischen Schäden im ZNS der Multiple-Sklerose-Patienten führt.

7. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Peter, J.S. (2000) Cellular and molecular Immunology. W.B. Saunders Company
- Acha-Orbea, H., Mitchell, L., Timmermann, L., Wraith, D.C., Tausch, G.S., Waldor, K., Zamvil, S.S., McDevit, H.O. and Steinmann, L. (1988) Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell*, **54**: 263
- Adams, E.J., Chien, Y.H. and Garcia, K.C. (2005) Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science*, **308**(5719): 227-31
- Ali, M., Weinreich, M., Balcaitis, S., Cooper, C.J. and Fink, J. (2003) Differential regulation of peripheral CD4+ T-cell tolerance induced by deletion and TCR revision. *J. Immunol.*, **171**(11): 6290-6
- Allcock, R.J., Martin, A.M. and Price, P. (2000) The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease. *Immunol. Today*, **21**(7): 328-32
- Amor, S., Groome, N., Linington, C., Morris, M.M., Dornmair, K., Gardinier, M.V., Matthieu, J.M. and Baker, D. (1994) Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J. Immunol.*, **153**: 4349-4356
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. and Mathis, D. (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, **298**(5597): 1395-401
- Andersson, M., Yu, M., Soderstrom, M., Weerth, S., Baig, S., Solders, G. and Link, H. (2002) Multiple MAG peptides are recognized by circulating T and B lymphocytes in polyneuropathy and multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.*, **9**: 243-251
- Arnett, K.L., Harrison, S.C. and Wiley, D.C. (2004) Crystal structure of a human CD3-epsilon/delta dimer in complex with a UCHL1 single chain antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(46): 16268-73
- Babbe, H., A. Roers, et al. (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, **192**(3): 393-404
- Baumann, N. and Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, **81**: 871-927
- Bach, J.F. (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.*, **347**: 911-920
- Benoist, C. and Mathis, D. (1990) Regulation of major histocompatibility complex class II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**: 681-715
- Berg, L.J., Pullen, A.M., Fazekas de St Grith, B., Mathis, D., Benoist, C. and Davis, M.M. (1989) Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell*, **58**(6): 1035-46

- Berger, T., Rubner, P., Schautzer, F., Egg, R., Ulmer, H., Mayringer, I., Dilitz, E., Deisenhammer, F. and Reindl, M. (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N. Eng. J. Med.*, **349**(2): 139-45
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A. and Kuchroo, V.K. (2003) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.*, **197**: 1073-1081
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. and Kuchroo, V. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, **441**(7090): 235-8
- Brabb, T., Goldrath, A.W., von Dassow, P., Paez, A., Liggitt, H.D. and Goverman, J. (1997) Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J. Immunol.*, **159**: 497-507
- Breithaupt, C., Schubart, A., Zander, H., Skerra, A., Huber, R., Linington, C. and Jacob, U. (2003) Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**: 9446-9451
- Brown, A.M. and McFarlin, D.E. (1981) Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Lab. Invest.*, **45**(3): 278-84
- Bruno, R., Sabater, L., Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Escudero, D., Martinez-Caceres, E. and Pujol-Borrell, R. (2002) Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur. J. Immunol.*, **32**: 2737-2747
- Burnett, F. (1959) The clonal selection theory of acquired immunity. *Cambridge University Press, London*
- Butcher, E.C. and Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, **272**: 60-6
- Campbell, J.J. and Butcher, E.C. (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.*, **12**: 336-41
- Chang, J.Z., Shevach, E. M. and Segal, B.M. (1999) Regulation of Interleukin (IL)-12 Receptor β 2 Subunit Expression by Endogenous IL-12: A Critical Step in the Differentiation of Pathogenic Autoreactive T Cells. *J. Exp. Med.*, **189**(6): 969-978
- Charcot, J.M. (1868) Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette Hôpitaux*, **41**: 554, 557-558, 566
- Christen, U. and von Herrath, M.G. (2005) Infections and autoimmunity-good or bad? *J. Immunol.*, **174**: 7481-7486
- Chien, Y.H., Jore, R. and Crowley, M.P. (1996) Recognition by gamma/delta T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**: 511-32
- Clements, C.S., Reid, H.H., Beddoe, T., Tynan, F.E., Perugini, M.A., Johns, T.G., Bernard, C.C. and Rossjohn, J. (2003) The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**: 11059-11064
- Compston, A., Confavreux, C., Lassmann, H., McDonald, I., Miller, D., Noseworthy, J., Smith, K and Wekerle, H. (2006) *McAlpine's Multiple Sclerosis 4th Edition*, *Churchill Livingstone Elsevier*

- Corr, M., Slanetz, A.E., Boyd, L.F., Jelonek, M.T., Khilko, S., Al-Ramadi, B.K., Kim, Y.S., Maher, S.E., Bothwell, A.L. and Margulies, D.H. (1994) T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics and specificity. *Science*, **265**(5174): 946-9
- Cross, A.H., Tuohy, V.K. and Raine, C.S. (1993) Development of reactivity to new myelin antigens during chronic relapsing autoimmune demyelination. *Cell. Immunol.*, **146**(2): 261-9
- Cross, A.H., Trotter, J.L. and Lyons, J. (2001) B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J. Neuroimmunol.*, **112**: 1-14
- Cua, D. J., Hinton, D. R., Stohlman, S.A. (1995) Self-antigen-induced Th2 responses in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)-resistant mice. Th2-mediated suppression of autoimmune disease. *J. Immunol.*, **155**(8): 4052-9
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L. , To.,W, Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., and Sedgwick, J.D. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation in the brain. *Nature*, **421**(6924): 744-8
- Davidson, A. and Diamond, B. (2001) Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.*, **345**: 340 - 350
- Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, **334**: 395-402
- Dean, G; Kurtzke, J.F. (1971) On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br. Med. J.*, **3**: 725-729
- Delarasse, C., Daubas, P., Mars, L.T., Vizler, C., Litzenburger, T., Iglesias, A., Bauer, J., Della Gaspera, B., Schubart, A., Decker, L., Dimitri, D., Roussel, G., Dierich, A., Amor, S., Dautigny, A., Liblau, R. and Pham-Dinh, D. (2003) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J. Clin. Invest.*, **112**: 544-553
- Demotz, S., Grey, H.M. and Sette, A. (1990) The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science*, **249**(4972): 1028-30
- Derbinski, J., Schulte, A. Kyewski, B. and Klein, L. (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.*, **2**: 1032–1039
- Dyment, D.A., Ebers, G. C. and Sadovnick, A.D. (2004) Genetics of multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.*, **3**(2): 104-10
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L. and Zaller, D.M. (1993) Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell*, **72**: 551-560
- Gardinier, M.V., Amiguet, P., Linington, C. and Mathieu, J-M (1992) Myelin / oligodendrocyte glycorotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J. Neurosci. Res.*, **33**: 177-187
- Gilden, D.H. (2005) Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*, **4**: 195-202
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M, Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**(5425): 221-7

- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D. and Fathman, C.G. (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*, **156**(1): 5-7
- Fitz, R.B. and Kalvakolanu, I. (1995) Thymic expression of the golli-mylein basic protein gene in the SJL/J mouse. *J. Neuroimmunol.*, **57**(1-2): 93-9
- Friese, M. A. and Fugger, L. (2005) Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?" *Brain*, **128**(Pt 8): 1747-63
- Fujinami, R.S. and Oldstone, M.P., (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science*, **230**(4729): 1043-5
- Furuzawa-Carballeda, J., Vargas-Rojas, M.I. and Cabral, A.R. (2007) Autoimmune inflammation from the TH17 perspective. *Autoimmune. Rev.*, **6**(3): 169-75
- Genain, C.P., Nguyen, M.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, M., Lees, M.B., Linnington, C. and Hauser, S.L. (1995) Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J. Clin. Invest.*, **96**: 2966-2974
- Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L. and Raine, C.S. (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.*, **5**: 170-175
- Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt and Barbara A. Osborne (2002) Kuby Immunology 4th Edition, *Freeman, H.W.*, New York
- Hauser SL, et al. (1986) Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, **19**: 578-587
- Harding, C.V. and Unanue, E.R. (1990) Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature*, **346**(6284): 574-6
- Hemmer, B., Archelos, J.J. and Hartung, H.P. (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**: 291-301
- Hofstetter, H.H., Toyka, K.V., Tary-Lehmann, M. and Lehmann, P. (2007) Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139-151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. *J. Immunol.*, **178**(3): 1372-8
- Huessmann, M., Scott, B., Kisielow, P. and von Boehmer, H. (1991) Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell*, **66**(3): 533-40
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlen, C. and Goverman, J. (2001) A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, **194**(5): 669-76
- Huseby, E.S., Sather, B., Huseby, P.G. and Goverman, J. (2001b) Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity*, **14**: 471-481
- Iglesias, A., Bauer, J., Litznerberger, T., Schubart, A. and Linnington, C. (2001) T- and B-Cell responses to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *GLIA*, **36**: 220-234

- Ito, K., Bian, H.J., Molina, M., Han, J., Magram, J., Saar, E., Belunis, C., Bolin, D.R., Arceo, R., Campbell, R., Falcioni, F., Vidovic, D., Hammer, J. and Nagy, Z.A. (1996) HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, **183**: 2635-2644
- Jacobson, D. L., Gange, S.J., Rose, N.R. and Graham, N.M. (1997) Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **84**: 223-243
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002) Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*, **125**(Pt 3): 538-50
- Janeway, C. and Travers, P. (1997) Immunologie 2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*
- Johns, T.G. and Bernard, C.C. (1999) The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neurochem.*, **72**: 1-9
- Johnes, R.E., Bourdette, D., Moes, N., Vandenbark, A., Zamora, A. and Offner, H. (2003) Eptiope Spreading is not required for relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.*, **170**(4): 1690-8
- Kabat, E.A. Wolf, A. and Bezer, A.E. (1947) The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.*, **85**: 117-130
- Kappler, J.W., Skidmore, B., White, J. and Marrack, P. (1987) Antigen-inducible, H-2-restricted, interleukin-2-producing T-cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J. Exp. Med.*, **153**: 1198-214
- Kerlero de Rosbo, N., Hoffman, M., Mendel, I., Yust, I., Kaye, J. F., Bakimer, R., Flechter, S., Abramsky, O., Milo, R., Karni, A., Ben-Nun, A. (1997) Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur. J. Immuno.*, **27**: 3059-3069
- Kjier-Nielsen, L., Dunstone, M.A., Kostenko, L., Ely, L.K., Beddoe, T., Mifsud, N.A., Purcell, A.W., Brooks, A.G., McCluskey, J. and Rossjohn, J. (2004) Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(20): 7675-80
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K.A., Tuohy, V.K. and Kyewski, B. (2000) Shaping of the auto-reactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.*, **6**: 56-61
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K. and Iwakura, Y. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **177**(1): 566-73
- Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. and Mathis, D. (1996) Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* **87**(5): 811-22
- Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H. and Holz, A. (2006) Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J. Clin. Invest.*, **116**(9): 2385-92

- Krishnamoorthy, G. (2006) Dissertation: Devoc mouse: a double transgenic mouse model of human opticospinal multiple sclerosis and autoimmune T-B cell cooperation.
- Kuhle, J., Pohl, C., Mehling, M., Edan, G., Freedman, M.S., Hartung, H.P., Polman, C.H., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Dahms, S., Lindber, R., Kappos, L. and Sandbrink, R. (2007) Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N. Engl.J. Med.*, **356**(4): 371-8
- Kurschus, F. (2001) Dissertation: Der Einfluß eines fötal exprimierten Autoantigens auf die Induktion von Autoimmunität während der Schwangerschaft.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M. and Tonegawa, S. (1994) High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*, **78**: 399-408
- Lambracht, D., Prokop, C., Hedrich, H.-J., Lindahl, K.-F., Wonigeit, K (1995) Mapping of H2-M homolog and MOG genes in the rat MHC. *Immunogenetics*, **42**: 418-421
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685
- Lassmann, H., Kitz, K. and Wisniewski, H.M. (1981b) In vivo effect of sera from animals with chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis on central and peripheral myelin. *Acta Neuropathol.*, **55**(4): 297-306
- Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombraill, P. and Boutry, J.M. (1986) The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin. Exp. Immunol.*, **66**: 423-434
- Lefranc, M.P., Clement, O., Kaas, Q., Duprat, E., Chastellan, P., Coelho, I., Combres, K., Ginestoux, C., Giudicelli, V., Chaume, D. and Lefranc, G. (2005) IMGT-Choreography for immunogenetics and immunoinformatics. *In Silico Biology*, **5**: 45-60
- Lehmann, P.V., Sercarz, E.E., Forsthuber, T., Dayan, C.M. and Gammon, G. (1993) Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire *Immunol. Today*, **14** (5): 203-208
- Linnington, C., Webb, M. and Woodhams, P. L. (1984) A novel myelin-associated glycoprotein defines by a mouse monoclonal antibody. *J. Neuroimmunol.*, **6**: 387-96
- Litzenburger, T., Fassler, R., Bauer, J., Lassmann, H., Linnington, C., Wekerle, H. and Iglesias, A. (1998) B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **188**: 169-180
- Linares, D., Mana, P., Goodyear, M., Chow, A.M., Clavarino, C., Huntington, N.D., Barnett, L., Koentgen, F., Tomioka, R., Bernard, C.C., Freire-Garabal, M. and Reid, H.H. (2003) The magnitude and encephalogenic potential of autoimmune response to MOG is enhanced in MOG deficient mice. *J. Autoimmun.*, **21**: 339-351
- Linthicum, D.S. and Frelinger, J. A. (1982) Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J. Exp. Med.*, **156**: 31-40
- Liu, G.Y., Fairchild, P.J., Smith, R.M., Prowle, J.R., Kioussis, D., and Wraith, D.C. (1995) Low avidity recognition of self antigen by T cells permit escape from central tolerance. *Immunity*, **3**(4): 407-15

- Lublin, F.D., Maurer, P.H., Berry, R.G. and Tippet, D. (1981) Delayed, relapsing allergic encephalomyelitis in mice. *J. Immunol.*, **126**(3): 819-22
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B. Rodriguez, M. and Lassmann, H. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.*, **47**: 707-717
- Lyons, D.S., Lieberman, S.A., Hampl, J., Boniface, J.J., Chien, Y., Berg, L.J. and Davis, M.M. (1996) A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity*, **5**: 53-61
- Lyons, J. A., San, M., Happ, M. P. and Cross, A. H. (1999) B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 3432-3439
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., Krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., Wucherpfennig, K.W. and Fugger, L. (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat. Genet.*, **23**: 343-347
- Marta, C.B., Taylor, C.M., Coetzee, T., Kim, T., Winkler, S., Bansal, R. and Pfeiffer, S.E. (2003) Antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to its rapid repartitioning into detergent-insoluble fractions, and altered protein phosphorylation and cell morphology. *J. Neurosci.*, **23**: 5461-5471
- Marta, C.B., Montano, M.B., Taylor, C.M., Bansal, R. and Pfeiffer, S.E. (2005) Signaling cascades activated upon antibody cross-linking of myelin oligodendrocyte glycoprotein: potential implications for multiple sclerosis. *J. Bio. Chem.*, **280**(10): 8985-93
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. and Mathis, D. (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* **286**(5445): 1732-5
- McGargill, M.A., Derbinski, J.M. and Hogquist, K.A. (2000) Receptor editing in developing T-cells. *Nat. Immunol.*, **1**(4): 336-41
- McFarland, H.F., Lin H.C., Patnaik, M. and Jacobson, S. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.*, **3**(12): 1394-7
- McRae, B.L., Vanderlugt, C. L., Dal Canto, M. C. and Miller, S.D. (1995) Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, **182** (1): 75-85
- Mendel, I., Natarajan, K., Ben-Nun, A. und Shevach, E.M. (2004) A novel protective model against experimental allergic encephalomyelitis in mice expressing a transgenic TCR-specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J. Neuroimmunol.*, **149**(1-2): 10-21
- Mor, F., Boccaccia, G.L. and Unger, T. (1998) Expression of autoimmune disease-related antigens by cells of the immune system. *J. Neurosci. Res.*, **54**: 254-262
- Morgan, I.M. (1946) Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey cord. *J. Bakteriolog.*, **51**: 614-615
- Olerup, O. and Hillert, J. (1991) HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical Evaluation, *Tissue Antigens*, **38** (1): 1-15

- Oldstone, M.B. (2005) Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **296**:1-17
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. and Lafaille, J.J. (1998) Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, **188**: 1883-1894
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. and Lanzavecchia, A. (1993) Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science*, **262**: 422-2
- Padula, S., Lingenheld, E., Stabach, P., Chou, C.-H., Kono, D. and Clark, R. (1991) Identification of encephalitogenic V β -4-bearing T cells in SJL/J mice – Further evidence for the V Region Hypothesis ? *J. Immunology*, **146**: 879-883
- Paterson, P.Y. (1960) Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.*, **111**: 119-136
- Perchellet, A., Stromnes, I., Pang, J.M. and Goverman, J. (2004) CD8+ T cells maintain tolerance to myelin basic protein by 'epitope theft'. *Nat. Immunol.*, **5**: 606-614
- Pearson, C.I., van Ewijk, W. and McDevitt, H.O. (1997) Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **185**: 583-599
- Peterson, L.K., Tsunoda, I., Masaki, T and Fucinami, R.S. (2006) Polyreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: Implication for systemic autoimmunity in progressive experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, **183**: 69-80
- Piddlesden, S. J., Lassmann, H., Zimprich, F., Morgan, B. P. and Linington, C. (1993) The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am. J. Pathol.*, **143**: 555-564
- Pircher, H., Mak, T.W., Lang, R., Ballhaus, W., R., Hengarten, H., Zinkernagel, R.M. and Bürki, K. (1989) T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor Vb8.1 chain transgenic mice. *E.M.B.O.*, **8**(3): 719-727
- Pham-Dinh, D., Mattei, M.-G., Nussbaum, J.-L., Roussel, G., Pontarotti, P, Roeckel, N., Mather, I.H., Artzt, K., Lindahl, K.F., Dautigny, A. (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**: 7990-7994
- Pham-Dinh, D., Jones E. P., Pitiot, G., Della Gaspera, B., Daubas, P., Mallet, J., Le Paslier, D., Lindahl, K.F., Dautigny, A. (1995) Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region. *Immunogenetics*, **42**: 386-391
- Prineas JW, Wright RG. (1978) Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis lesions. *Lab. Invest.*, **38**: 409-421
- Racke, M.K., Hu, W. and Lovett-Racke, A.E. (2005) PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends Immunol.*, **26**: 289-291
- Reddy, J., Waldner, H., Zhang, X., Illes, Z., Wucherpfennig, K.W., Sobel, R.A. and Kuchroo, V.K. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **175**: 5591-5595

- Reindl, M., Linington, C., Brehm, U., Egg, R., Dilitz, E., Deisenhammer, F., Poewe, S. and Berger T. (1999) Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain*, **122** (11): 2047-56
- Reindl, M., Khalil, M. and Berger, T. (2006) Antibodies as biological markers for pathological processes in MS. *J. Neuroimmunol.*, **180**: 50-62
- Rehm, H., (2000) “*Der Experimentator : Proteinbiochemie*”, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Seiten 6-9
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H. and Berry, G. P. (1933) Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.*, **58**: 39–53
- Romagnani, S. (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immuno. Today*, **18**(69): 263-6
- Saiki, R.K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-492
- Sakaguchi, S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance. *Cell*, **101**(5): 455-8
- Samelson, L.E., Donovan, J.A., Isakov, N., Ota, Y. and Wange, R.L. (1995) Signal transduction mediated by the T-cell antigen receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **766**: 157-72
- Sanderson, C.J., Campbell, H.D. and Young, I.G. (1988) Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (IL-5) and its effect on human and mouse B cells. *Immunological Reviews*, **102**: 29-50
- Schönrich, G., Momburg, F., Hammerling, G.J. and Arnold, B. (1992) Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur. J. Immunol.*, **22**(7): 1687-91
- Seamons, A., Perchellet, A. and Goverman, J. (2003) Immune tolerance to myelin proteins. *Immunol. Res.*, **28**: 201-221
- Seddon, B. and Mason, D. (2000) The third function of the thymus. *Immunol. Today*, **21**(2): 95-9
- Shevach, E.M. (2000) Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **18**: 423-49
- Snell, G.D. (1948) Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genetics*, **49**: 87-108
- Soldan, S.S., Berti, R., Salem, N., Secchiero, P., Flamand, L., Calabresi, P.A., Brennan, M.B., Maloni, H.W., McFarland, H.F., Lin, H.C., Patnaik, M. and Jacobson, S. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.*, **3**: 1394-1397
- Sospedra, M. and Martin, R. (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 683-747
- Stadelmann und Bruck, 2003 Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neuro. Sci.*, **24** Suppl 5: 265-7
- Stroch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallstrom, E., Kerschensteiner, M, Olsson, T., Linington, C. and Lassmann, H. (1998) Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.*, **8**(4): 681-94

- Strachan, D.P. (2000) Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*, **55** Suppl 1: S2-10
- Stuart, G. and Krikorian, K.S. (1928) The neuro-paralytic accidents of rabies treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **22**: 327-377
- Suggs, S.V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E.H., Johnson, M.J., Itakura, K. und Wallace, R.R.B. (1981) Use of synthetic oligo-deoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences using purified genes. "Developmental Biology" (Hrsg. D.D. Brown und C.F. Fox), Academic Press, New York, Seiten 683-693
- Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H. and Raine, C.S. (2001) Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.*, **166**: 7579-7587
- Sun, Z.J., Kims, K.S., Wagner, G. and Reinherz, E.L. (2004) Mechanisms contributing to T cell receptor signalling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell*, **105**(7): 913-23
- Suryani, S. and Sutton, I. (2007) An interferon-gamma-producing th1 subset is the major source of I-17 in experimental autoimmune encephalitis. *J. Neuroimmunol.*, **183**(1-2): 96-103
- Swanborg, R.H. (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **77**: 4-13
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**: 575-81
- Tonra, R.S. (2002) Cerebellar susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice : Potential interaction of immunology with vascular anatomy. *The Cerebellum*, **1**:57-68
- Tuohy, V.K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J.A. and Kinkel, P.R. (1999) Regression and spreading of self-recognition during the development of autoimmune demyelinating disease. *J. Autoimmun.*, **13**: 11
- Traugott, U., Reinherz, E.L., Raine, C.S. (1983) Multiple sclerosis. Distribution of T cell subsets within active chronic lesions, *Science*, **219**: 308-310
- Urban, J.L., Kumar, V., Kono, H.D., Gomez, C., Horvath, S.J., Clayton, J., Ando, E., Sercarz, E.E. and Hood, L. (1988) Restricted use of T cell receptor V genes in murine autoimmune encephalomyelitis raises possibilities for antibody therapy. *Cell*, **54**: 577
- Urban, J.L., Horvath, S.J. and Hood, L. (1993) Autoimmune T cells: immune recognition of normal and variant peptide epitopes and peptide-based therapy. *Cell*, **59**: 257-71
- Valitutti, S. and Lanzavecchia, A. (1997) Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol. Today*, **18**: 299-304
- Vanderlugt, C.L., Neville, K.L., Nikeevich, K.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A. and Miller, S.D. (2000) Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **164**(2): 670-8.
- Viola, A. and Lanzavecchia, A. (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, **273**: 104-6
- Vukusic S und Confavreux, C. (2006) Multiple Sklerosis and Pregnancy *Rev. Neurol.*, **162**(3):293-4

- Waldner, H., Whitters, M.J., Sobel, R.A., Collins, M. and Kuchroo, V.K. (2000) Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**: 3412-3417
- Waldner, H., Collins, M. and Kuchroo, V.K. (2004) Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J. Clin. Invest.*, **113**: 990-997
- Wegener, A.M., Hou, X., Dietrich, J. and Geisler, C. (1995) Distinct domains of the CD3-gamma chain are involved in surface expression and function of the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**(9): 4675-80
- Wekerle, H. and Kurschus, F. (2006) Animal models of multiple sclerosis, *Drug Discovery Today: Dis Models*, **3**(4): 359-367
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H. and Linington, C. (1994) Animal models. *Ann. Neurol.*, **36** Suppl.: 47-53
- Wensky, A.K., Furtado, G.C., Garibaldi Marcondes, M.C., Chen, S., Manfra, D., Lira, S.A., Zagzag, D and Lafaille, J.J. (2005) IFN γ determines distinct clinical outcomes in autoimmune encephalomyelitis. *Journ. Immunol.*, **174**: 1416-1423
- Wikipedia: <http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite>
- Wiley&Sons (2004) Animal Models for autoimmune and inflammatory disease. *Current Protocols in Immunology Online*: Chapter 15.1
- Wucherpfennig K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L. and Hafler, D.A. (1992) Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**: 4588-4592
- Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, **80**(5): 695-705
- Xiao, B.G., Linington, C. and Link, H. (1991) Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J. Neuroimmunol.*, **31**: 91-96
- Yu, M., Johnson, J.M. and Tuohy, V.K. (1996) A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J. Exp. Med.*, **183** (4):1777-88
- Zamvil, S.S., Mitchell, N.E., Lee, A.C., Moore, M.K., Waldor, K., Sakai, J.B., Rothbard, H.O., McDevitt, O., Steinman, L. and Acha-Orbea, H. (1988) Predominant expression of a T cell receptor Vbeta gene subfamily in autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, **167**: 1586
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**: 701-2

8. Anhang

8.1. DNA-Sequenz der V α 8.3- und V β 4-Kette des T-Zell-Rezeptors des C3-T-Zellklons

V α 8.3-Kette

Klon pBS-V α 8.3-HIFI # 4 (819 bp/272 As)

5' SalI | Start
GGT**GTCGAC**CTTCC**ATG**AACATGCGTCCTGACACCTCCTCAGTTCTTGTGCTCCTCCTAATGCTC
Frame Work Region-1
AGGAGGAGCAATGGAGATGGAGACTCCGTGACCCAGACAGAAGGCCTGGTCACTCTCACAGAA
CDR1-Region
GGGTTGCCTGTGATGCTGAACTGCACCTATCAG**ACTATTTACTCAAATGCTTTC**CTTTTCTGGTAT
Frame Work Region-2 CDR2-Region
GTGCACTATCTCAATGAATCCCCTCGGCTACTCCTGCGG**AGCTCCACAGACAACAAGAGGACCG**
Frame Work Region-3
AGCACCAAGGGTTCCACGCCACTCTCCATAAGAGCAGCAGCTCCTTCCATCTGCAGAAGTCTCTA
CDR3-Region
GCGCAGCTGTCAGACTCTGGCCTGTACTACTGT**GCTTTGAGTGGGGCA**ACAATGCCCCACGAT
Konstante Region →
TTGGAGCGGGAACCAAATTAACAGTAAAACCAAACATCCAGAACCCAGAACCTGCTGTGTACCAG
TTAAAAGATCCTCGGTCTCAGGACAGCACCCCTCTGCCTGTTACCGACTTTGACTCCCAAATCAA
TGTGCCGAAAACCATGGAATCTGGAACGTTTCATCACTGACAAAACCTGTGCTGGACATGAAAGCTA
TGGATTCCAAGAGCAATGGGGCCATTGCCTGGAGCAACCAGACAAGCTTCACCTGCCAAGATAT
CTTCAAAGAGACCAACGCCACCTACCCCAGTTCAGACGTTCCCTGTGATGCCACGTTGACCGAG
AAAAGCTTTGAAACAGATATGAACCTAACTTTCAAACCTGTGAGTTATGGGACTCCGAATCCTC
CTGCTGAAAGTAGCGGGATTTAACCTGCTCATGACGCTGAGGCTGTGGTCCAGTT**GAGGATCCT**
| Stop BamHI 3'

Vβ4-Kette

Klon pBS-Vβ4-Pfu # 1 (924 bp/307 As)

5' SalI | Start
GGT **GTCGAC** TGACACTGCT **ATG** GGCTCCATTTTCCTCAGTTGCCTGGCCGTTTGTCTCCTGGTGG
SalI **Frame Work Region-1**
CAGGTCCA **GTCGAC** CCGAAAATTATCCAGAAACCAAATATCTGGTGGCAGTCACAGGGAGCGA
CDR1-Region
AAAAATCCTGATATGCGAACAGTAT **CTAGGCCACAATGCT** ATGTATTGGTATAGACAAAGTGCTAA
Frame Work Region-2 **CDR2-Region**
GAAGCCTCTAGAGTTCATGTTTTCC **TACAGCTATCAAAAACCTT** ATGGACAATCAGACTGCCTCAA
Frame Work Region-3
GTCGCTTCCAACCTCAAAGTTCAAAGAAAAACCATTTAGACCTTCAGATCACAGCTCTAAAGCCTG
CDR3-Region
ATGACTCGGCCACATACTTCTGTGCCAGCAGCCAA **GAACGGACAGATAGTGCAGAAACGCTGT**
Konstante Region →
ATTTTGGCTCAGGAACCAGACTGACTGTTCTCGAGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAGGTC
TCCTTGTTTGAGCCATCAAAGCAGAGATTGCAAACAAACAAAAGGCTACCCTCGTGTGCTTGGC
CAGGGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAGGAGGTCCACAG
TGGGTCAGCACGGACCCTCAGGCCTACAAGGAGAGCAATTATAGCTACTGCCTGAGCAGCCGCC
TGAGGGTCTCTGCTACCTTCTGGCACAATCCTCGAAACCACTTCCGCTGCCAAGTGCAGTTCCAT
GGGCTTTCAGAGGAGGACAAGTGGCCAGAGGGCTCACCCAAACCTGTCACACAGAACATCAGTG
CAGAGGCCTGGGGCCGAGCAGACTGTGGAATCACTTCAGCATCCTATCATCAGGGGGTTCTGTC
TGCAACCATCCTCTATGAGATCCTACTGGGGAAGGCCACCCTATATGCTGTGCTGGTCAGTGGC
CTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGAAAAAAATTCCT **TG**AGACAACTTTTATGCATCCTGAGCCG
|
Stop
TTTCTCACCC BamHI 3'
GGATCC TATA

8.2 Sequenz-Vergleich der $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Kette des C3-T-Zellklons mit der IMGT-Datenbank

Die erhaltenen Sequenzen für die $V\alpha 8.3$ -Kette und $V\beta 4$ -Kette des C3-T-Zellklons wurden mit Hilfe der IMGT-Datenbank (<http://imgt.fr>) bzgl. ihrer Homologie zu bereits bekannten T-Zell-Rezeptoren der gleichen Spezifität untersucht (siehe Tab. 8.1).

$V\alpha 8.3$ -Kette	V-Sequenz	J-Sequenz	C-Sequenz
T-Zell-Klon C3	Siehe	Siehe 8.1	Siehe 8.1
IMGT-Nomenklatur	TRAV12D-3*02	TRAJ43*01/02	TRAC*01
Arden, B -Nomenklatur	AV8S2/AV8S10	J α _new.04	C α
Lee, I-Nomenklatur	TRAV12-3	-	-
NCBI-Datenbank	AC005402	M64239	M64239
Unterschied	1.) 51.As in FR-2: R(CGG) : W(TGG) 2.) 100.As in FR-3: G(GGC) : A(GCC) 3.) 108.As in CDR3 : G(GGG) :G(GAG)	-	-

$V\beta 4$ -Kette	V-Sequenz	D-Sequenz	J-Sequenz	C-Sequenz
T-Zell-Klon C3	Siehe Anhang	Siehe Anhang	Siehe Anhang	Siehe Anhang
IMGT-Nomenklatur	TRBV2*01	TRBD1*01	TRBJ2-3*01	TRBC2 *01
Arden, B -Nomenklatur	4	D- β 1-1	J- β -2	C- β -2
Wilson, R-Nomenklatur	4S1	-	-	-
NCBI-Datenbank	AE000663	X00933	K02802	M26057
Unterschied	-	-	-	-

Tabelle 8.1:

Mit Hilfe des Programms IMGT/V-Quest konnten die V-, (D-), J- und C-Sequenzen der $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Kette vom C3-T-Zellklon mit bereits bekannten TZR-Sequenzen der gleichen Spezifität verglichen werden.

Angegeben ist die Bezeichnung der $V\alpha 8.3$ - und $V\beta 4$ -Sequenzen in den unterschiedlichen Nomenklaturen (IMGT, Arden, B und Wilson, R) sowie die Zugangs-Nummern von bereits bekannten TZR-Sequenzen in der NCBI-Datenbank zu der die identifizierten Sequenzen des C3-T-Zellklons homolog waren. Unterschiede sind in der letzten Zeile angegeben.

$V\alpha 8.3$ -Kette: V-Sequenz bis auf drei Nukleotide identisch mit TRAV12D-3*02 (AC005402); J- und C-Region-Sequenz zu 100% homolog mit TRAJ43*01/02 (M64239) bzw. TRAC*01 (M64239).

$V\beta 4$ -Kette: V-Sequenz 100% homolog zu TRBV2*01 (AE000663), D-Sequenz zu TRBD1*01 (X00933), die J-Sequenz zu TRBJ2-3*01 (K02802) und C-Region zu TRBC2 *01 (M26057).

8.3 Schematische Darstellung des pHSE3'-Expressionsvektors

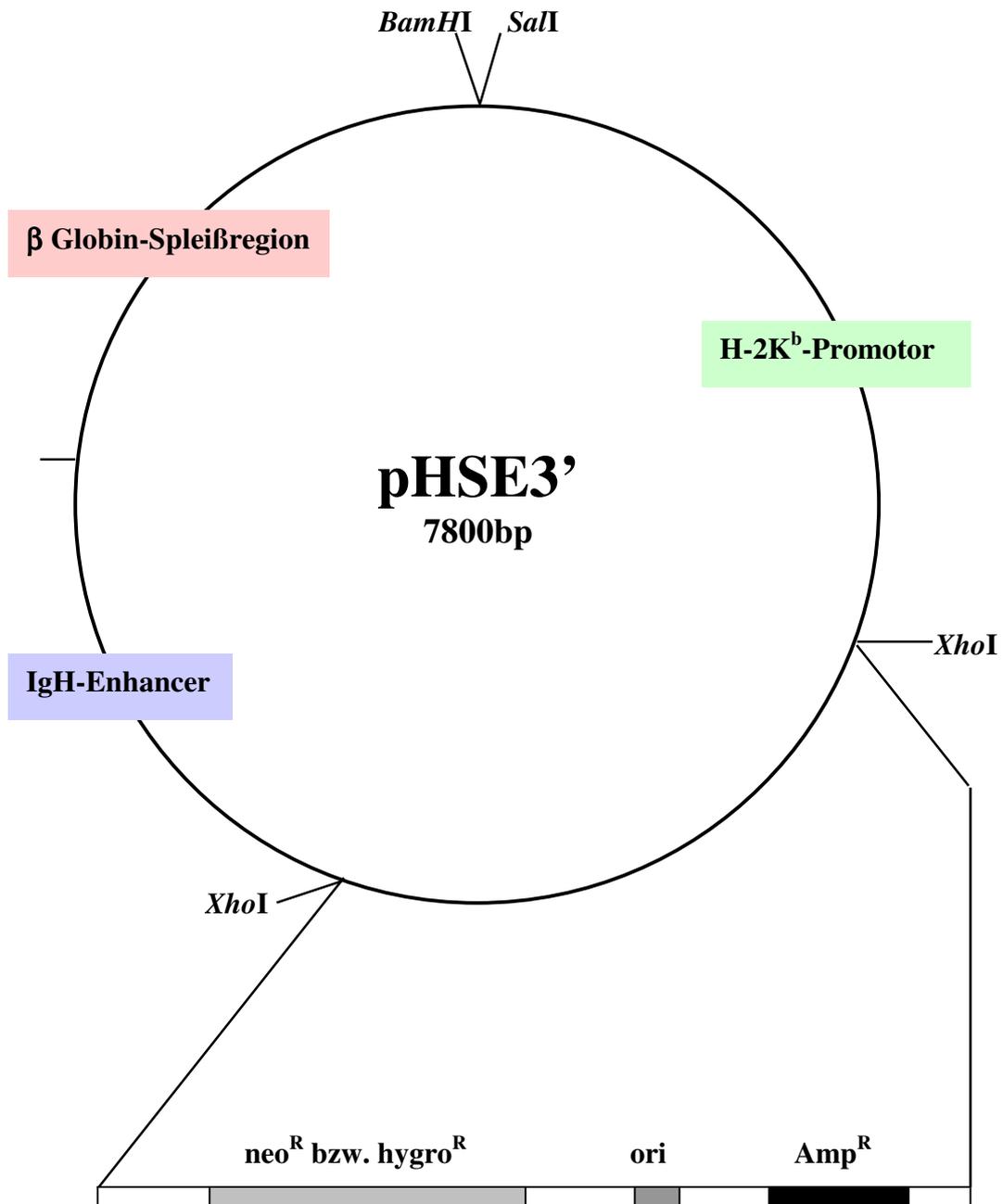


Abbildung 8.2:
Aufbau des pHSE3'-Vektors

Die zu klonierende Sequenz wird zwischen die *Sal*I- und *Bam*HI-Schnittstelle ligiert. Die transgene Expression des Konstrukts wird vom 5'-gelegenen murinen MHC-Klasse-I-Promotor H-2K^b (2kb) und vom 3'-lokalisierten Enhancer der schweren Kette der Immunglobuline (1.5kb) gesteuert. Das unmittelbar 3' an die subklonierten Sequenz angegliederte poly-(A)-Signal des humanen β-Globin-Gens (1.7kb) gewährleistet eine optimale posttranskriptionelle Modifikation der Konstrukte (Pircher et al., 1989). Über die *Xho*I-Restriktionsenzym-Schnittstelle kann das Konstrukt von den bakteriellen Komponenten, *ori* und *Amp*^R-Gen, getrennt werden.

8.4 Abkürzungen

α -	<u>anti</u>
Abb.	<u>Abbildung</u>
ADCC	engl.: <u>antibody-dependent cell cytotoxicity</u>
add.	engl.: <u>additional</u>
ADP	engl.: <u>adenosin-di-phosphat</u>
APC	<u>Antigenpräsentierende Zelle</u> , engl.: <u>cell</u>
Ar Ham	<u>Armenischer Hamster</u>
as	<u>Antisense</u>
As	<u>Aminosäuren</u>
BCDF	engl.: <u>B cell differentiation factor</u>
Bio	<u>Biotin</u>
bp	<u>Basenpaare</u>
BSA	<u>Bovines Serum Albumin</u>
Bzgl.	<u>Bezüglich</u>
CD	engl.: <u>cluster of differentiation</u>
CDR	engl.: <u>complementary determining region</u>
cDNA	engl.: <u>complementary (zur RNA) komplementäre DNA</u>
CFA	engl.: <u>complete Freund's adjuvant</u>
CNP	engl.: <u>2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase</u>
cm	engl.: <u>centimeter, Zentimeter</u>
CTLA-4	engl.: <u>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</u>
Cur. Pr.	engl.: <u>Current Protocols</u>
d	engl.: <u>day</u>
DAG	<u>Diacylglycerin</u>
d. h.	<u>das heißt</u>
DNA	engl.: <u>desoxyribonucleid acid</u>
cpm	engl.: <u>counts per minute</u>
EAE	<u>Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis</u>
EBV	<u>Eppstein Barr Virus</u>
ELISA	engl.: <u>enzyme-linked immunosorbent assay</u>
Endkonz.	<u>Endkonzentration</u>
Engl.	<u>Englisch</u>
FCS	engl.: <u>fetal calf sera</u>
g	<u>Gramm</u>
GITR	engl.: <u>glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene</u>
Golli	engl.: <u>gene expressed in the oligodendrocyte lineage</u>
HBV	<u>Hepatitis B Virus</u>
hBTN	<u>humanes Butyrophilin</u>
hERMAP	<u>humanes Erythrozytenmembran-assoziiertes Protein</u>
HLA	<u>Humane Leukozyten Antigen</u>
hMOG	<u>humanes MOG</u>
HRP	engl.: <u>horse reddish peroxidase</u>
HSV	<u>Herpes Simplex Virus</u>
IDDM	engl.: <u>insulin dependant diabetes mellitus</u>
IFA	engl.: <u>incomplete Freund's adjuvant</u>
IFN γ	<u>Interferon gamma</u>
IL-	<u>Interleukin-</u>
Ig	<u>Immunglobulin</u>
I. p.	<u>Intraperitoneal</u>
IP ₃	<u>Inositoltriphosphat</u>
IP-10	engl.: <u>IFN-inducible protein-10</u>
IPTG	<u>Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid</u>
ITAM	engl.: <u>immunreceptor tyrosine-based activation motif</u>
ITIM	engl.: <u>immunreceptor tyrosine-based inhibitory motif</u>

kDa	<u>k</u> ilo <u>D</u> alton
LDAO	<u>L</u> auryl- <u>d</u> imethyl- <u>N</u> - <u>a</u> mino <u>x</u> id
l	<u>L</u> iter
Lsg.	<u>L</u> ösung
(m)	<u>m</u> ännlich
m	<u>m</u> illi
M	<u>M</u> olar
MAG	engl.: <u>m</u> yelin- <u>a</u> ssociated <u>g</u> lycoprotein
MAPK	engl.: <u>m</u> itogen- <u>a</u> ssociated protein <u>k</u> inase
Mat. & Meth.	<u>M</u> aterial und <u>M</u> ethoden
MBP	<u>M</u> yelin <u>B</u> asisches <u>P</u> rotein
Men.	<u>M</u> eningen
Mesenz.	<u>M</u> esenzephalon
MΦ	<u>M</u> akrophagen
MHC	engl.: <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
min	<u>M</u> inuten
mind.	<u>M</u> indestens
ml	<u>M</u> illiliter
mfMOG	<u>M</u> OG aus <u>M</u> acaca <u>f</u> ascicularis
MOBP	<u>M</u> yelin-assoziertes <u>O</u> ligodendrozyten <u>B</u> asisches <u>P</u> rotein
MOG	engl.: <u>m</u> yelin <u>o</u> ligodendrocyte <u>g</u> lycoprotein
MRI	engl.: <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance <u>i</u> maging
Ms	engl.: <u>m</u> ouse
MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose
mTEC	engl.: <u>m</u> edullary <u>t</u> hymic epithelial <u>c</u> ell
n. a.	engl.: <u>n</u> icht <u>a</u> nalysiert
NaAc	<u>N</u> atrium- <u>A</u> acetat
NFAT	engl.: <u>n</u> uclear <u>f</u> actor of <u>a</u> ctivated <u>T</u> cells
NFκB	engl.: <u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> appa <u>b</u>
OG	engl.: <u>O</u> ligodendrocyte
OIND	engl.: <u>o</u> ther <u>i</u> nflammatory <u>n</u> eurological <u>d</u> iseases
ONND	engl.: <u>o</u> ther <u>n</u> on-inflammatory <u>n</u> eurological <u>d</u> iseases
OSP	engl.: <u>O</u> ligodendrozyten-spezifisches <u>P</u> rotein
PAMP	engl.: <u>p</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern
Partiel.	<u>P</u> artielle
PBL	engl.: <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>l</u> eucocytes
PBS	engl.: <u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PE	<u>P</u> hycoerythrin
Periventr.	engl.: <u>p</u> eriventricular
PV	engl.: <u>p</u> erivaskular
PIP ₂	<u>P</u> hosphatidyl <u>i</u> nsitol-4,5-bisphosphat
PLP	engl.: <u>p</u> roteolipid <u>p</u> rotein
PPWM	engl.: <u>p</u> eriplaque <u>w</u> hite <u>m</u> atter
P.tx.	<u>P</u> ertussis <u>t</u> ox <u>i</u> n
RA	engl.: <u>r</u> heumatoide <u>a</u> rthritis
RAG	engl.: <u>r</u> ecombination- <u>a</u> ctivating <u>g</u> ene
rMOG	<u>M</u> OG aus <u>R</u> atte;
RNA	engl.: <u>r</u> ibonucleid <u>a</u> cid
Rpm	engl.: <u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RR	engl.: <u>r</u> elapsing- <u>r</u> emitting
s	<u>S</u> ekunde
SEM	engl.: <u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean
SLE	engl.: <u>s</u> ystemic <u>l</u> upus <u>e</u> rythematodes
SPF	engl.: <u>s</u> pecific <u>p</u> athogen <u>f</u> ree
Std.	<u>S</u> tunde

Tab.	<u>T</u> abelle
TLR	engl.: <u>T</u> OLL-like receptor
TNF α	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor <u>a</u> lpha
TZR / TCR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor, engl.: <u>T</u> cell receptor
ü. N	über <u>N</u> acht
usw.	und <u>s</u> o <u>w</u> eiter
(w)	<u>w</u> eiblich
Wt	<u>W</u> ildtyp
ZAP-70engl.:	ζ -associated protein 70
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem
z. T.	zum <u>T</u> eil

Geboren am 21.10.1977
Adresse Ahornstrasse 23
85774 Unterföhring, Deutschland
Tel. +49 (89) 57004078
Mobil +49 (0) 1775474874
E-mail poellinger@neuro.mpg.de



Seit 04/2004

Promotionsstudent am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, Deutschland

Abteilung Neuroimmunologie, Prof. H. Wekerle

Herstellung eines T-Zell-Rezeptor-transgenen Mausmodells für spontane schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

02/2003 - 12/2003

Diplomarbeit

Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Max-von-Pettenkofer-Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene, Prof. Ch. David
Molekulare Analyse der *Yersinia*-Wirtszell-Interaktion

1997-2004

Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

2004: Diplom in Biologie (Note 1,0)

Fächer: Zellbiologie, Immunologie, Genetik, Molekulare Infektionsbiologie

1999: Vordiplom in Biologie (Note 1,3)

1988-1997

Gymnasium Grafing, Deutschland (Abitur Note 1,3)

Publikationen

Abstract of 8th International congress of Neuroimmunology, Nagoya, Japan:

Pöllinger, B., Gurumoorthy, K., Lassmann, H., Wekerle, H. and Holz, A. (2006) The RR-mouse: A double-transgenic SJL/J mouse model of spontaneous relapsing-remitting Multiple Sclerosis, *J. Neuroimmunol.*, **178**: 191,

Pöllinger, B., Gurumoorthy, K., Lassmann, H., Kurschus, F., Holz, A., Wekerle, H. (2007) RR Mouse: Spontaneous relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis due to MOG responsive T cell receptor transgene with recruitment of endogenous MOG specific B lymphocytes (in Vorbereitung)

Danke ...

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Hartmut Wekerle dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, diese interessante Arbeit in seinem Department am Max-Planck-Institut durchzuführen. Neben seinen überragenden und vorausschauenden wissenschaftlichen Fähigkeiten konnte ich auch viel von seiner respekt- sowie humorvollen Menschlichkeit lernen, und dafür möchte ich ihm ganz herzlich danken.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Elisabeth Weis aus der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken, die die Betreuung meiner Arbeit an der Fakultät für Biologie freundlicherweise übernahm.

Außerdem gilt mein besonderer Dank natürlich meinen beiden Betreuern Dr. Andreas Holz (2004-2006) und Dr. Florian Kurschus (2006-2007). Beide trugen mit ihren fundierten Kenntnissen und ihrer ungetrübten Leidenschaft für die Naturwissenschaft viel dazu bei, dass ich nicht nur zahlreiche Techniken von ihnen lernen, sondern auch eine kritische, aber nicht minder begeisterte wissenschaftliche Haltung entwickeln konnte.

My more than special THANK YOU is devoted to my colleague and dear friend Guru who accompanied me all this time. Not only that I learned most of the techniques from him – be it in the mouse house or in the Indian kitchen – but also I appreciated a lot his scientific passion, his advice and helping hand at any time. 

An dieser Stelle möchte ich mich darüber hinaus ganz besonders bei Herrn Prof. Hans Lassmann aus dem Institut für Hirnforschung in Wien bedanken. Die in seinem Labor durchgeführten histologischen Analysen lernten uns die neuropathologischen Vorgänge in unseren Tieren besser zu verstehen, und seine freundliche Art machte es immer möglich, Fragen zu stellen.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Alexander Flügel bedanken, der mich nicht nur in seinem Literatur-Seminar willkommen hieß, sondern auch immer wieder konstruktive Kritik an meiner Arbeit übte, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Außerdem gilt natürlich mein großer Dank auch Frau „Dr. Irene Arnold-Ammer“, die unzählige Genotypisierungen für mich durchgeführt hat und mir ein leuchtendes Beispiel war, wie man Reklamationen tätigt ☺.

Ein ganz spezielles Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch Frau Gabi Künzel aussprechen, die mir bei der Betreuung der Tiere eine sehr große Hilfe war. Darüber hinaus möchte ich mich aber auch bei Lydia Penner und Michaela Krug bedanken, die mir sehr bei der Kontrolle der Mäuse geholfen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Bösl aus dem Transgenen Service des Max-Planck-Instituts bedanken, der es mir netterweise nicht nur ermöglichte, bei der Herstellung der transgenen Tiere anwesend zu sein, sondern mich auch sogar selbst dabei mit Hand anlegen ließ.

Abschließend gilt meine tiefe Dankbarkeit meiner Familie und meiner Julia, die mich in diesen Jahren stets mit Stolz und Mitgefühl, Großherzigkeit und Liebe begleitet haben.