

Charakterisierung der molekularen Interaktionen bei der Antigenerkennung
Glutaminsäure-Decarboxylase-reaktiver T-Lymphozyten
beim insulinabhängigen Diabetes mellitus

Carmen Huck

Institut für Immunologie

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Charakterisierung der molekularen Interaktionen bei der Antigenerkennung
Glutaminsäure-Decarboxylase-reaktiver T-Lymphozyten
beim insulinabhängigen Diabetes mellitus

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
bei der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe
genehmigte
Dissertation

von
Carmen Huck
aus Rastatt (Baden)

1998

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.98

Referent: Prof. Dr. Margot Zöller

Korreferent: Prof. Dr. Dolores J. Schendel

Zusammenfassung

Insulinabhängiger Diabetes mellitus ist eine Autoimmunkrankheit bei der die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas durch einen chronischen inflammatorischen Prozeß zerstört werden. Neben inselzellspezifischen Autoantikörpern spielen bei diesem pathogenen Vorgang autoreaktive T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle. Eines der Hauptantigene, die von diesen T-Zellen erkannt werden, ist das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD). Analysen dieser GAD-reaktiven T-Zellen und deren T-Zellrezeptor (TZR) Interaktionen mit den spezifischen Liganden aus GAD-Peptiden und humanen Leukozytenantigenen (HLA) könnten bei der Identifizierung prädiabetischer Patienten und bei der Entwicklung von Immuninterventions- und Therapieverfahren sehr hilfreich sein.

Um diese molekularen Mechanismen der Antigenerkennung durch GAD-spezifische T-Lymphozyten genauer zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst T-Zelllinien und -klone aus den peripheren Blutlymphozyten von neu-diagnostizierten Diabetespatienten etabliert. Alle fünf, aus einem HLA-DR4 homozygoten Patienten etablierten spezifischen T-Zellklone erkennen ein Epitop, das zwischen den Aminosäurepositionen p563-575 der GAD lokalisiert ist. Ein Vergleich mit den erkannten GAD-Epitopen anderer Linien und Klone zeigt, daß bei jedem Patienten eine andere Sequenz der GAD erkannt wird. Die Präsentation des GAD-Epitops erfolgt durch das Restriktionselement HLA-DR53, das ein Heterodimer der DR- α -Kette zusammen mit der DRB4- β -Kette darstellt, die parallel zur DRB1*0401-(DR4)-kodierte Kette auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dieser HLA-DR53/p563-575 Komplex wird von den T-Zellen durch einen TZR erkannt, der die variablen V-Familien V α 2 bzw. V α 21 gepaart mit V β 2 exprimiert. Vergleichende Analysen des TZR-Repertoires GAD-spezifischer T-Zelllinien und -klone weiterer Diabetespatienten zeigten einen unterschiedlichen V-Gengebrauch. Auch die mit dem GAD-Peptid direkt interagierenden CDR3-Regionen der TZR unterscheiden sich bei den einzelnen Patienten.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß die molekularen Mechanismen der Antigenerkennung GAD-reaktiver T-Lymphozyten beim insulinabhängigen Diabetes mellitus bei den verschiedenen Patienten individuell unterschiedlich erfolgten.

Summary

Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) is an autoimmune disease in which the insulin producing β -cells are destroyed by a chronic inflammatory process. While β -cell specific autoantibodies are produced, autoreactive T cells seem to play a crucial role in the pathogenic destruction process. One of the major antigens recognized by these T cells is the enzyme, glutamic acid decarboxylase (GAD). Analyses of GAD-reactive T cells and their T cell receptor (TCR) interactions with specific complexes of GAD-derived peptides presented by human leukocyte antigen (HLA) molecules in IDDM may be useful in efforts to identify prediabetic patients for immune intervention and therapy.

In this study T cell lines and clones of recent onset IDDM patients were established from peripheral blood lymphocytes to analyse the molecular mechanisms of antigen recognition by GAD-specific T lymphocytes. All five specific T cell clones of a HLA-DR4 homozygote patient recognize an epitope that is located in amino acid positions p563-575. These lines and clones show different GAD-sequence recognition when compared with GAD-epitopes recognized by T cells of other patients. The GAD-epitope p563-575 is presented by the HLA-DR53 molecule, a heterodimer of DR- α and DRB4- β chains that is expressed simultaneously with the DRB1*0401-(DR4) encoded chain at the cell surface. This HLA-DR53/p563-575 complex is recognized by a TCR utilizing the variable families V α 2 or V α 21 paired with V β 2. TCR repertoire comparisons of GAD-specific T cell lines and clones of further diabetes patients revealed different V-gene usage. The CDR3-region of the TCR that interacts directly with the GAD-peptide is also different among individual patients.

These findings indicate that individualized patterns of antigen recognition by GAD-reactive T lymphocytes contribute to development of insulin-dependent diabetes mellitus in different patients.

Inhalt

A. Einleitung	1
A.1. Die Rolle des Immunsystems beim insulinabhängigen Diabetes.....	1
A.2. Das NOD-Mausmodell	2
A.3. Die Rolle der T-Lymphozyten.....	4
A.4. Der T-Zellrezeptor (TCR)	7
A.5. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	9
A.5.1. Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-II	11
A.5.2. Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-I	12
A.6. HLA-Klasse-II und Krankheitsassoziation	12
A.7. Zielsetzung der Arbeit	15
B. Material	17
B.1. Geräte	17
B.1.1. Allgemeine technische Geräte	17
B.1.2. Technische Geräte für die Zellkultur	17
B.1.3. Technische Geräte für die Molekularbiologie und Biochemie	18
B.2. Verbrauchsmaterial für die Zellkultur	19
B.2.1. Chemikalien	19
B.2.2. Lösungen und Puffer.....	19
B.2.3. Kulturmedien	19
B.2.4. Plastikwaren	21
B.2.5. Antikörper.....	21
B.2.6. Zellen	22
B.2.7. Peptide.....	24
B.3. Verbrauchsmaterial für die Molekularbiologie und Biochemie	26
B.3.1. Chemikalien	26
B.3.2. Lösungen, Puffer und Medien.....	27
B.3.2.1. Universelle Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	27
B.3.3. Enzyme	27
B.3.4. Versuchssysteme ("Kits")	27
B.3.6. Oligonukleotide	29
B.3.6.1. Oligonukleotide für die TCR-V α PCR.....	29
B.3.6.2. Oligonukleotide für die TCR-V β PCR.....	30
B.3.6.3. Oligonukleotide für die Sequenzierung	31
B.3.7. Sonstige Nukleinsäuren	31
B.3.8. Sonstige Materialien.....	31
B.4. Firmenverzeichnis	32
C. METHODEN	33
C.1. Methoden der Zellkultur	33
C.1.1. Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL).....	33
C.1.2. Bestimmung der Zellzahl.....	33
C.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
C.1.3.1. Einfrieren.....	33
C.1.3.2. Auftauen.....	34
C.1.4. Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit Phytohämagglutinin	34

C.1.5.	Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien.....	34
C.1.6.	Restimulation der T-Helfer Zellen	34
C.1.7.	Klonierung GAD-spezifischer T-Zellklone aus den polyklonalen Linien	35
C.1.8.	Proliferationstest	35
C.1.9.	Antikörper-Inhibitions Test	36
C.1.10.	Bestimmung der TNF- α Sekretion im zellulären Test	36
C.1.11.	Separation von Subpopulationen durch magnetpartikel-gekoppelte monoklonale Antikörper	37
C.1.12.	Kultivierung und Passagierung adhärenter Zellen	37
C.1.13.	Kultivierung EBV-transformierter B-Zelllinien.....	38
C.1.14.	Analyse der Oberflächenantigene mittels Durchfluß-zytometrie am fluoreszenzaktivierten Zellseparator (FACScan).....	38
C.2.	Molekularbiologische Methoden.....	39
C.2.1.	RNA-Isolation aus T-Zelllinien	39
C.2.2.	Fällung von RNA.....	39
C.2.3.	Auftrennung der PCR-Amplifikate durch horizontale Agarosegelelektrophorese	40
C.2.4.	Reverse Transkription von RNA.....	40
C.2.5.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
C.2.5.1.	TCR-spezifische PCR-Amplifikation.....	42
C.2.6.	Sequenzierung der TCR-Amplifikate am A.L.F. mittels Fluoreszeinmarkierung.....	43
C.2.6.1.	Trennung der DNA-Stränge mittels Magnetpartikeln	44
C.2.6.2.	Sequenzierung von DNA-Einzelsträngen mit Fluoreszein- markierung.....	44
C.3.	Biochemische Methoden.....	46
C.3.1.	Herstellung eines Gesamtzelllysats aus EBV-transformierten B- Lymphozyten.....	46
C.3.2.	Unspezifische Proteinbindung an Lentil-Lectin Sepharose	47
C.3.3.	Isolierung von DR-Molekülen über CNBr-aktivierte Sepharose	47
C.3.4.	Trennung von DR-Molekülen über Protein G-Sepharose	48
C.3.5.	SDS-PAGE	48
C.3.6.	Silberfärbung.....	48
C.3.7.	Western Blot zum Nachweis der DR-Moleküle mit Hilfe von Antikörpern und Chemifluoreszenz	49
C.3.8.	HLA-DR-Peptid Bindungstest.....	50

D. Ergebnisse51

D.1.	Etablierung GAD-spezifischer T-Zellen	51
D.1.2.	GAD-spezifische T-Helfer-Zellen	53
D.2.	Bestimmung des antigenen Epitops.....	54
D.2.1.	Bestimmung der erkannten GAD-Peptid Sequenz.....	55
D.2.1.1.	Stimulation GAD-spezifischer T-Zellen mit Peptidpools.....	56
D.2.1.2.	Stimulation durch die Einzelpeptide des Pools 10	58
D.2.1.3.	Definition des Minimalepitops	59
D.2.2.	TNF- α Sekretion.....	62
D.2.3.	Stimulationspotential der Epitope von TCC anderer Patienten	63
D.2.4.	Identifizierung der HLA-Anker und der T-Zellrezeptor-Kontaktpositionen ...	65
D.3.	Restriktionselement.....	67
D.3.1.	Stimulation durch verschiedene HLA-Moleküle.....	68
D.3.2.	Inhibition mit anti-HLA Antikörpern.....	72

D.3.2.1.	HLA-Expression auf der T-Zell-Oberfläche	74
D.3.2.2.	Einfluß der HLA-Antikörper auf die T-Zellen	75
D.3.3.	DR53-transfizierte Mausfibroblasten stimulieren den GAD-spezifischen T-Zellklon.....	76
D.3.3.1.	Inhibition der transfektantenvermittelten Stimulation durch anti-HLA-Antikörper.....	79
D.3.4.	Ankerpositionen des GAD-Epitops an HLA-DR53	80
D.3.4.1.	Isolierung von HLA-DR53-Molekülen aus einem Zellysate	83
D.3.4.2.	Bindungstest	84
D.4.	T-Zellrezeptor.....	86
D.4.1.	TCR-Expression der TCC des Patienten 40	87
D.4.1.1.	Detektion der TCR-Ketten auf der Zelloberfläche	90
D.4.2.	Vergleich der V α - und V β -Kettenexpression von TCC verschiedener Patienten.....	92
D.4.3.	Sequenzen der CDR3-Region	94
D.4.4.	Vergleich der CDR3-Domänen von GAD-spezifischen TCC verschiedener Patienten	95
D.5.	Molekulare Interaktion bei der Antigenerkennung GAD-reaktiver T-Lymphozyten des Patienten 40.....	99
E. Diskussion.....		100
E.1.	GAD-spezifische T-Lymphozyten beim insulin-abhängigen Diabetes.....	100
E.1.1.	GAD-Spezifität der etablierten T-Zelllinien und -klone	101
E.2.	Epitoperkennung.....	102
E.2.1.	Peptidvakzinierung.....	102
E.2.2.	Erkennung unterschiedlicher GAD-Epitope bei verschiedenen Patienten	103
E.2.3.	Kreuzreaktion GAD-spezifischer T-Lymphozyten mit viralem Cocksackiepeptid?.....	106
E.2.4.	Erkennung mehrerer Epitope durch eine T-Zelllinie	106
E.3.	HLA-Restriktion	107
E.3.1.	Epitoperkennung bei Patient 40 erfolgt HLA-DRB4*01 (DR53)-restringiert	108
E.4.	Erkennung des HLA-Peptid Komplexes durch den T-Zellrezeptor.....	111
E.4.1.	Detektion von zwei α -Ketten bei GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40.....	111
E.5.	Pathogenese des insulinabhängigen Diabetes	113
E.6.	Ausblicke.....	115
F. Abkürzungen		117
G. Literatur.....		120
Lebenslauf		130

A. Einleitung

A.1. Die Rolle des Immunsystems beim insulinabhängigen Diabetes

Die Diagnose "insulinabhängiger Diabetes" war noch Anfang dieses Jahrhunderts ein sicheres Todesurteil. Die Patienten starben innerhalb weniger Monate, da die Langerhans'schen Inseln des Pankreas das lebenswichtige Stoffwechselformon Insulin nicht mehr produzieren konnten. Heute dagegen wird es Millionen von Menschen durch tägliche Insulininjektionen ermöglicht mit dieser Krankheit zu leben. Dennoch ist eine echte Heilung derzeit nicht in Sicht. Die Patienten müssen weiterhin mit schweren Folgeerscheinungen wie Blindheit, Schlaganfällen oder Nierenversagen rechnen.

Durch die exogene Gabe von Insulin ist es nicht möglich, den Hormonspiegel im Blut so fein zu regulieren, wie es der Stoffwechsel erfordert und wie nur die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln in der Lage sind. Doch beim Ausbruch der Krankheit sind bereits mehr als 90% dieser Zellen durch das eigene Immunsystem zerstört.

Die Analyse dieses β -zellspezifischen Angriffs durch inflammatorische Zellen ist die Grundlage zum Verständnis dieser Autoimmunkrankheit und die Voraussetzung zur Entwicklung geeigneter Diagnose und Therapieverfahren. Nur durch ein frühzeitiges Eingreifen in diesen selbstzerstörerischen Prozeß des Immunsystems wäre es möglich, die Krankheit zu verhindern und dem Körper die Chance zu geben, mit eigenem Insulin zu leben.

Weltweit bemühen sich viele Wissenschaftler, diesem Autoimmunprozeß auf den Grund zu gehen. Auch meine Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung der molekularen Mechanismen bei der β -Zellzerstörung.

Die Beteiligung des Immunsystems beim insulinabhängigen Diabetes konnte erstmals beobachtet werden, als Patienten kurz nach der Diagnose verstorben waren: sie zeigten eine starke Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit

A. Einleitung

inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen und Lymphozyten (Bottazzo et al., 1985). Diese sog. Insulitis ist ein erstes Zeichen für die Entwicklung eines pathogenen Zerstörungsprozesses. Das Vorkommen dieser inselzellspezifischen Lymphozyten ist jedoch nicht nur auf den Pankreas beschränkt. Sie sind auch im peripheren Blut von Patienten zu finden. Bereits in der prädiabetischen Phase, noch Jahre vor Krankheitsausbruch, können die von den B-Lymphozyten produzierten Antikörper detektiert werden, die gegen verschiedene Inselantigene gerichtet sind. Neben Insulin, der Tyrosinphosphatase IA-2 (Payton et al., 1995), Carboxypeptidase H (Castano et al., 1991), Peripherin (Boitard et al., 1992) und einzelnen Hitzeschock-Proteinen (Jones et al., 1990), stellt die Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) (Baekkeskov et al., 1990) wohl eines der wichtigsten Autoantigene dar. Man findet Antikörper gegen dieses Enzym bei ca. 80% aller Prädiabetiker (Bonifacio et al., 1990).

Dennoch scheinen diese humoralen Komponenten des Immunsystems nicht kausal in die Pathogenese involviert zu sein. Der Titer an Autoantikörpern kann über Jahre hinweg sehr hoch sein, ohne daß sich zwingend Diabetes entwickelt. Es erfolgt auch keine Krankheitsübertragung von einer diabetischen Mutter auf ihr Kind, obwohl die Antikörper sehr wohl durch die Plazenta in den Fötus gelangen können. Und auch in einem Tiermodell führt die Übertragung inselzellspezifischer Antikörper nicht zu einem Krankheitsausbruch in der Empfängermaus. Vielmehr scheint es sich um einen zellulären Immunprozeß zu handeln, für dessen Untersuchung das sogenannte NOD-Mausmodell bereits viele hilfreiche Dienste geleistet hat.

A.2. Das NOD-Mausmodell

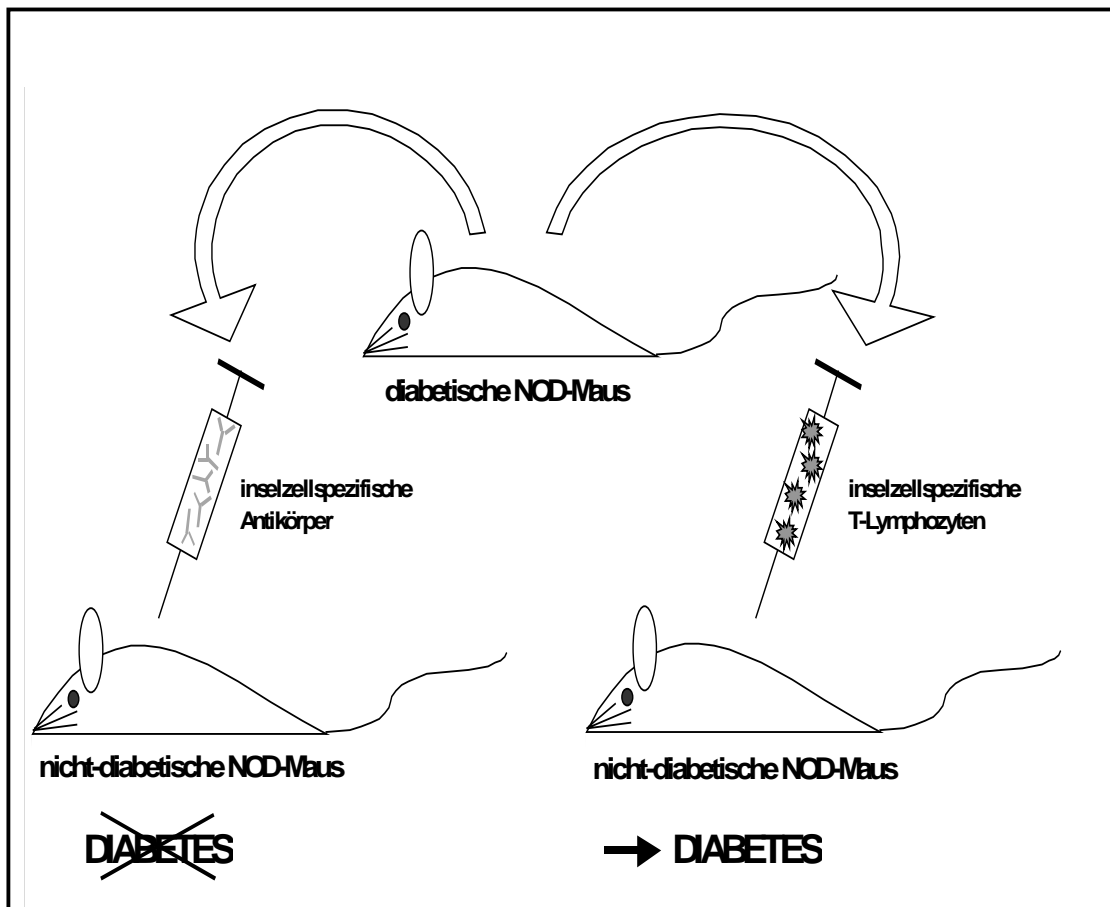
Nonobese (NOD) Mäuse entwickeln spontan insulinabhängigen Diabetes, da sie eine genetische Prädisposition für diese Krankheit besitzen (Makino et al, 1985; Wicker et al, 1987). Diese ist an die Gene des Haupthistokompatibilitätsantigenkomplexes (MHC; major histocompatibility complex) gekoppelt (Hattori et al, 1986), wobei die MHC-Gene allein nicht ausreichen. Die Inzidenz einer Krankheitsentwicklung unterscheidet sich zwischen 20% bei männlichen und 80%

A. Einleitung

bei weiblichen Mäusen, was auf einen hormonellen Einfluß hinweist. Außerdem erhöht sich bei männlichen Mäusen die Diabetesrate nach einer Testektomie auf die der Weibchen.

Die immunogenen Mechanismen gegen die insulinproduzierenden β -Zellen dieser Mäuse scheinen sich analog zu den auch im humanen System ablaufenden autoreaktiven Prozessen zu entwickeln. Daher bieten sie ein ideales Modell zur Erforschung der Diabeteserkrankung.

Die Übertragung inselzellspezifischer Antikörper von einer diabetischen auf eine nicht-diabetische Maus bleibt, wie bereits oben erwähnt, wirkungslos. Anders stellt es sich allerdings bei einem Transfer von Immunzellen, vor allem von T-Lymphozyten dar. Hier kann in der Empfängermaus schon nach wenigen Tagen eine Insulinitis beobachtet werden und auch der Ausbruch der Krankheit ist unausweichlich (Wicker et al., 1986; Bendelac et al., 1987).



A. Einleitung

Abbildung A.2.a: Darstellung eines Experiments mit der NOD-Maus zur Klärung des krankheitsauslösenden Agens beim insulinabhängigen Diabetes mellitus.

Diese Experimente lieferten deutliche Hinweise auf die direkte Beteiligung der T-Lymphozyten am pathogenen Prozeß der β -Zellzerstörung. Dennoch konnten die genauen zellulären Mechanismen noch nicht vollständig geklärt werden und es wird noch einigen Forschungsaufwandes bedürfen, mehr Licht in das Dunkel der selbstzerstörerischen Aktivitäten des Immunsystems in die Tiefen der Langerhans'schen Inseln zu bringen.

A.3. Die Rolle der T-Lymphozyten

Die eigentliche Aufgabe der Lymphozyten ist es, fremde Eindringlinge wie Parasiten und Viren aufzuspüren. Diese werden von den sog. antigenpräsentierenden Zellen z.B. durch Phagozytose aufgenommen und sozusagen bruchstückweise als Epitope durch die Moleküle des MHC-Komplexes auf der Zelloberfläche präsentiert. Die MHC-Antigen-Komplexe werden daraufhin von den T-Lymphozyten durch spezifische Rezeptoren erkannt. Man spricht daher auch von einer adaptiven Immunantwort, im Gegensatz zur angeborenen Immunabwehr der unspezifisch phagozytierenden und lysierenden Makrophagen und der Natürlichen Killerzellen (NK). Aus dem gesamten Pool der zufällig erzeugten klonal exprimierten Antigenpezifitäten der Lymphozyten werden normalerweise die Zellen klonal deletiert, die gegen Selbstantigene gerichtet sind und diejenigen, die "Fremd" erkennen, positiv selektioniert. Diese Entscheidung erfolgt im Thymus, dem Reifungsort der aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen. Die nach dieser Selektion übriggebliebene periphere Antigenrezeptordiversität erreicht dennoch eine Zahl von 10^9 verschiedenen Spezifitäten (Watts und McConnel, 1987). Diese Selektion der T-Lymphozyten nach "Selbst-Fremd"-Erkennung verläuft nicht immer korrekt, was z.B. das Vorkommen autoreaktiver Lymphozyten und die Ausbildung von Autoimmunkrankheiten nach sich zieht. Zusätzlich können potentielle Autoimmunzellen durch periphere Toleranz unterdrückt werden. Versagen beide Mechanismen der Deletion, bzw. Regulation dieser Zellen, führt dies zur Autoimmunität.

A. Einleitung

Durch Antigenkontakt werden nur die Zellen stimuliert, die den entsprechenden T-Zellrezeptor (TCR) exprimieren. Diesem als klonale Selektion bezeichneten Vorgang folgt die klonale Expansion, d.h. die Proliferation dieser antigenspezifischen T-Lymphozyten. Hierfür ist jedoch noch ein zweites Signal notwendig, das der Erkennung kostimulatorischer Moleküle unterliegt. Erst durch die Interaktion der auf der T-Zelloberfläche exprimierten Kostimulatoren, wie z.B. der CD28-Moleküle mit B7-1 oder B7-2 auf den antigenpräsentierenden Zellen, kann das stimulatorische Signal der TCR-Interaktion realisiert werden. Fehlt dieses zweite Signal, fällt die T-Zelle in einen anergen Zustand, der letztendlich zum Tod des Lymphozyten führt.

T-Lymphozyten können in zwei große Gruppen unterteilt werden, die abhängig von der MHC-Restriktion unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen erfolgt in erster Linie durch zytotoxische T-Zellen. Diese MHC-Oberflächenantigene werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dienen dazu, den intrazellulären Status jeder Zelle für das Immunsystem sichtbar und damit kontrollierbar zu machen. Sie kehren sozusagen ihr Inneres nach außen, um bei einer pathogenen Veränderung, z.B. einer viralen Infektion, vom Immunsystem erkannt und zerstört zu werden. Die Interaktion des TCR mit den von MHC-Klasse-I-präsentierten Antigenpeptiden wird durch $CD8\alpha\beta$ -Glykoproteinen unterstützt, die als Korezeptoren auf den zytotoxischen T-Zellen fungieren. Diese Korezeptoren dienen auch der Einteilung der T-Lymphozyten, da eine zweite Gruppe von T-Zellen $CD4$ -Moleküle als Korezeptoren exprimiert, die die Interaktion des TCR mit Molekülen des MHC-Klasse-II-Komplexes unterstützen. Die MHC-Klasse-II-Expression ist normalerweise auf Zellen des hämatopoietischen Systems beschränkt. Nach Induktion, z.B. durch Zytokine wie Interferon- γ , kann die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen jedoch auch auf epithelialen Zellen induziert werden. Sie dient der Präsentation extrazellulärer Antigene, die von den entsprechenden antigenpräsentierenden Zellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen aufgenommen und in geeigneter Form für die T-Lymphozyten sichtbar gemacht wird. $CD4$ -positive Zellen fungieren dabei als sog. T-Helferzellen und stellen quasi die Kommandozentrale des Immunsystems dar.

A. Einleitung

Die stimulierten T-Helferzellen produzieren Zytokine, die Signale zwischen den immunkompetenten Zellen vermitteln. Dadurch wird eine Immunantwort initiiert bzw. verstärkt. Interleukin-2 (IL-2) zum Beispiel fördert sowohl die Proliferation der T-Helferzellen selbst als auch der zytotoxischen T-Zellen. Diese lysieren daraufhin die Körperzellen, die ihr spezifisches Antigen MHC-Klasse-I-assoziiert präsentieren. Die Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) hat verschiedene immunmodulatorische Eigenschaften, die zu einer optimalen Immunantwort beitragen. So steigert es z.B. die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und bewirkt die Induktion von MHC-Klasse-II-Molekülen unter anderem auf Epithelzellen, die diese Moleküle normalerweise nicht exprimieren (Basham et al., 1983, Schwartz et al., 1985, el Asrar et al., 1989). Dies ermöglicht eine Interaktion mit CD4⁺ T-Lymphozyten. Ein immunstimulatorischer Einfluß von IFN- γ wird auch beim Diabetes diskutiert, da hier die neuroendodermalen β -Zellen infiltrierter Inseln MHC-Klasse-II-Expression aufweisen (von Herrath und Oldstone, 1997). Ferner erhöht es die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (CD54) und LFA-3 (CD58), die eine wichtige Rolle beim Zusammenspiel zwischen T-Lymphozyten und deren Zielzellen spielen (Frohman et al., 1989). Ausserdem verstärkt IFN- γ die lytischen Mechanismen, die durch den Tumornekrosefaktor (TNF) und den Fas Liganden (FasL) vermittelt werden. Vor allem die Beteiligung von TNF- α an der Immunreaktivität gegen β -Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen postulieren eine eher protektive Wirkung von TNF- α bei der β -Zellzerstörung (McSorley et al., 1997), andere hingegen konnten eine erhöhte Produktion dieses Zytokins in den infiltrierten Langerhans'schen Inseln im Mausmodell nachweisen (Dahlén et al., 1998; Müller et al., 1995). Die erhöhte TNF- α Konzentration könnte auf die β -Zellzerstörung zum einen indirekt immunmodulatorisch oder auch direkt zytotoxisch wirken. Auch für die Beteiligung der Fas-FasL Interaktion bei der Pathogenese von Diabetes gibt es bereits Hinweise (Chervonsky et al., 1997). So scheint die Expression von Fas auf den β -Zellen induziert zu sein.

Die zellulären Mechanismen der Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen erweisen sich daher als sehr komplex. Was jedoch letztendlich bei dieser zytokinvermittelten Interaktion zwischen Lymphozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK) zum Tod der β -Zelle führt, konnte noch nicht

eindeutig geklärt werden. Sicher scheint jedoch, daß CD4-positive T-Helferzellen, die gegen verschiedene inselzellspezifische Antigene gerichtet sind, bei diesem Prozeß eine übergeordnete Rolle spielen. Eine wesentliche Grundlage stellt daher die Antigenerkennung der T-Lymphozyten durch ihren spezifischen TCR dar, dessen Organisation im folgenden Kapitel beschrieben wird.

A.4. Der T-Zellrezeptor (TCR)

Ca. 90-95% aller T-Lymphozyten exprimieren einen T-Zellrezeptor (TCR), der sich aus einem Heterodimer einer α - und einer β -Kette zusammensetzt (Meuer et al., 1983). Die restlichen T-Zellen tragen $\gamma\delta$ -Rezeptoren (Brenner et al., 1986), über deren Spezifität und Funktion noch relativ wenig bekannt ist (Davis et al., 1995, De Libero, 1997). Die TCR werden ausschließlich membranständig exprimiert, niemals aber sezerniert. Das über Disulfidbrücken verbundene, heterodimere Glykoprotein weist immunglobulinähnliche Strukturen auf, weshalb es bei den Molekülen der Ig-Superfamilie eingeordnet wird.

Jede T-Zelle exprimiert einen TCR mit einer anderen Spezifität (Mäkelä und Cross, 1970). Durch die Vielzahl von mehr als 10^9 verschiedener Rezeptoren ist es dem menschlichen Organismus möglich, spezifische T-Lymphozyten gegen nahezu alle Fremdartigene zu entwickeln (Watts und McConnel, 1987). Die hohe Diversität der antigenspezifischen TCR wird bereits auf genomischer Ebene determiniert. Die Gene für die TCR- α , - β , - γ und - δ Ketten bestehen, wie auch die Immunglobulingene, aus zahlreichen Gensegmenten. Diese werden im Zuge der T-Zelldifferenzierung auf somatischer Ebene individuell rekombiniert (Toyonaga et al., 1987, Davis et al., 1990). Man unterscheidet zwischen den variablen V-, den joining J- und den konstanten C-Segmenten, wobei bei der β -Kette noch weitere Diversität vermittelnde D-Segmente hinzukommen. Das Rearrangement der Gensegmente der β -Kette, die auf dem Chromosom 7 lokalisiert sind, erfolgt vor dem Rearrangement der auf Chromosom 14 kodierten α -Gensegmenten. Erst nach erfolgreicher Rekombination der β -Gensegmente auf einem der beiden homologen Chromosomen wird die α -Kette rearrangiert. Durch diesen als "allelic exclusion" bezeichneten

A. Einleitung

Vorgang wird die Bildung nur eines funktionellen TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimers gewährleistet. Absolut ist dieser allelische Ausschluß jedoch nicht. Es konnten sowohl T-Zellen mit zwei funktionellen α -Ketten (Padovan et al., 1993), als auch mit zwei funktionellen β -Ketten (Balomenos et al., 1995, Padovan et al., 1995) definiert werden.

Beim Rearrangement der β -Kette wird zunächst ein D β -Gensegment mit einem der 13 J β -Gensegmenten verknüpft. Anschließend wird dieses DJ β -Fragment an eines der 65 V β -Gensegmente angelagert (Rowen et al., 1996). Dabei werden alle dazwischenliegenden V-, D- und J-Segmente deletiert, so daß nun auf genomischer Ebene ein Rekombinationsprodukt, bestehend aus je einem V-, D- und J-Gensegment, vorliegt. Für dieses Rearrangement sind zum einen stark konservierte Rekombinationssignalsequenzen (RSS) verantwortlich, die die einzelnen Gensegmente flankieren, zum anderen ist hierbei die Aktivität der Rekombinationsproteine RAG1 und RAG2 entscheidend (Schatz et al., 1992, Hiom et al., 1997).

Erst wenn das Rearrangement der β -Kette erfolgreich beendet ist, wird der TCR- α -Genlocus rekombiniert. Dabei wird eines der ca. 60 V α -Gensegmente mit einem der ca. 60 J α -Gensegmente verknüpft (Gellert et al., 1992). Die Vervollständigung der α -, wie auch der β -Kette, d.h. die Rekombination der VJ α - und der VDJ β -Fragmente mit den jeweiligen C-Gensegmenten, erfolgt erst auf RNA-Ebene durch Spleißen.

Aus dieser Vielzahl an Rekombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Gensegmente der α - und β -Ketten resultiert eine enorme Diversität der TCR. Diese wird noch zusätzlich durch die sog. hypervariablen Regionen (CDR, complementarity determining regions) gesteigert. Während die Variabilität in den CDR1 und CDR2 Regionen auf genomischen Sequenzunterschieden zwischen den V-Genen basiert, wird die CDR3 Region durch N-Nukleotidsubstitution an den Grenzregionen zwischen den V- (D)- und J-Gensegmenten erzeugt. Einzelne Nukleotide werden durch Exonukleasen entfernt (Candeias et al., 1992), bzw. werden durch terminale Desoxynukleotidtransferasen zufällige Nukleotide eingefügt (Gilfillan et al., 1993). Durch diese flexible Genorganisation wird eine TCR-Diversität von

A. Einleitung

10^{15} verschiedenen Rezeptoren erreicht (Davis et al., 1988), was eine optimale Voraussetzung für die Erkennung aller möglichen Antigene bietet. Diese erfolgt in erster Linie über die V-Domänen der $\alpha\beta$ -Ketten, wobei die CDR-Regionen direkt mit dem MHC-Peptid Liganden interagieren. Die CDR3- Domäne tritt dabei in direkten Kontakt mit dem Antigenpeptid. Diese Interaktion erfolgt in erster Linie über elektrostatische Anziehungskräfte und Wasserstoffbrückenbildung zwischen den jeweiligen Aminosäureseitenketten. Analysen der Aminosäuresequenzen der CDR3-Regionen liefern dabei wichtige Hinweise auf die Struktur des erkannten Epitops. Daneben sind die Regionen CDR1 und CDR2 vorwiegend in die Interaktion mit dem MHC-Molekül involviert.

A.5. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die Erkennung eines Antigens durch die T-Zellen erfolgt ausschließlich in Assoziation mit den Molekülen des MHC-Komplexes (Zinkernagel und Doherty, 1974). Diese Peptidrezeptoren können in zwei Hauptklassen eingeteilt werden: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. Beide Genloci stammen von einem gemeinsamen Ursprungsgen ab, das sich vor mehr als 500 Millionen Jahren teilte (Klein und Figueroa, 1986). Heute unterscheiden sich diese beiden Peptidrezeptoren in ihrer Struktur, ihrer Funktion und ihrer Expression.

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einem Heterodimer einer polymorphen schweren Kette und einer nicht polymorphen leichten Kette, dem $\beta 2$ -Mikroglobulin, dessen Gen nicht in der MHC-Region kodiert wird (Bjorkmann et al., 1987a). Die Expression erfolgt auf allen kernhaltigen Körperzellen. MHC-Klasse-II-Moleküle setzen sich aus einem Heterodimer einer homogenen α -Kette und einer polymorphen β -Kette zusammen. Diese sind über Disulfidbrücken zwischen den Positionen 78 der α - und 15 der β -Kette verbunden. Die MHC-Klasse-II-Dimere werden nur auf bestimmten Zellen des Immunsystems, den dendritischen Zellen, nach Induktion durch ein Antigen auf B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen und nach Zytokininduktion auch auf epithelialen Zellen, exprimiert.

A. Einleitung

Die räumliche Struktur, die in die Antigenpräsentation involviert ist, ist bei beiden Rezeptoren gleich: ein β -Faltblatt, flankiert von zwei α -Helices, formiert die Peptidbindungsgrube (Bjorkmann et al., 1987b). Diese ist derart polymorph, daß sie mit einer Heterogenität von 10^{15} jedem möglichen antigenen Peptid eine Bindungsmöglichkeit bietet. Dieser Polymorphismus ist vor allem in der ersten Domäne lokalisiert und scheint in zwei bis vier hypervariable Regionen gruppiert zu sein.

Die Peptidrezeptoren des Menschen, die durch den MHC-Lokus auf dem Chromosom 6 kodiert werden, bezeichnet man als "humane Leukozyten Antigene", HLA. Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden von den Genloci HLA-A, HLA-B und HLA-C kodiert. Neben diesen klassischen gibt es noch weitere, nicht direkt in die Antigenpräsentation involvierte HLA-Allele: HLA-E (Koller et al., 1988), HLA-F (Geragthy et al., 1990) und HLA-G (Geragthy et al., 1987). Die HLA-Klasse-I-Moleküle präsentieren körpereigene und intrazelluläre "fremde" Peptide, die dadurch von den zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Die MHC-Klasse-II-Moleküle lassen sich in HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP einteilen. Auch hier gibt es neben den antigenpräsentierenden Hauptgruppen weitere Klasse-II-Allele, wie z.B. HLA-DM, dem eine eher regulatorische Funktion in der Peptidpräsentation zugesprochen wird. HLA-Klasse-II-Moleküle präsentieren extrazelluläre Antigene, die nach ihrer Aufnahme ins Zellinnere zunächst prozessiert werden, um dann als Peptidbruchstücke HLA-restringiert auf der Zelloberfläche zu erscheinen.

A.5.1. Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-II

Die Aufnahme des Antigens erfolgt je nach Art der antigenpräsentierenden Zelle durch Phagozytose, wie z.B. im Falle von Makrophagen, durch Pinozytose bei dendritischen Zellen oder durch antikörpervermittelte Endozytose bei B-Lymphozyten. Im Zellinnern befindet sich das Antigen in den Endosomen, wo es durch verschiedene Enzyme und dem darin herrschenden sauren pH in kleine Peptidfragmente zerlegt wird.

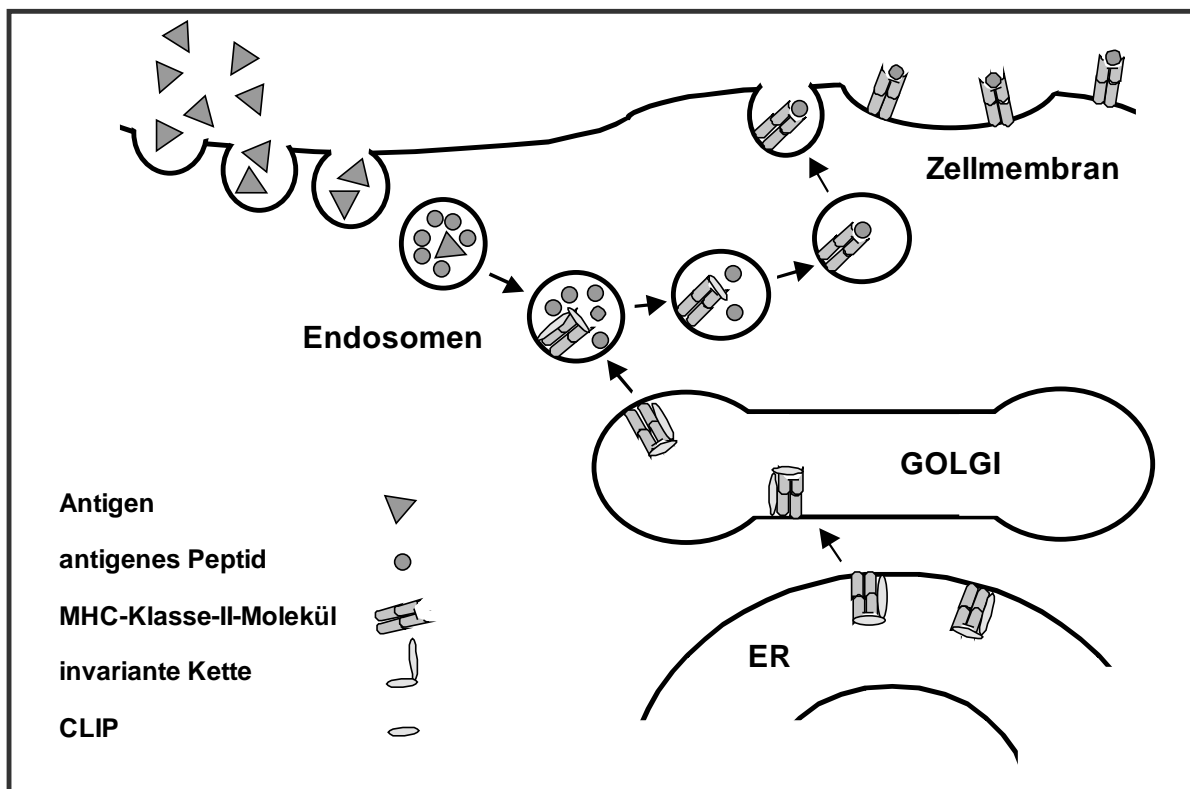


Abbildung A.5.1.a: Antigenprozessierung und -präsentation der MHC-Klasse-II-Moleküle

Hier erfolgt auch die Zusammenführung mit den HLA-Molekülen. Die aus dem ER, über den Golgi-Apparat in die Endosomen gelangenden HLA-Klasse-II-Moleküle sind bereits mit einem Peptid beladen, das die Bindung körpereigener intakter Peptidsegmente im ER verhindert. Dieses "Schutzpeptid" wird als invariante Kette bezeichnet (Germain, 1994, Sant und Miller, 1994, Williams und Watts, 1995). In

A. Einleitung

den Endosomen dissoziieren sie nun durch die Einwirkung des niedrigen pH's sowie spezifischer Proteasen von den MHC-Molekülen ab. Dabei bleibt zunächst noch das CLIP-Protein mit den MHC-Molekülen assoziiert und wird in einem nächsten Schritt unter dem Einfluß von HLA-DM Molekülen abgespalten. Die nun freie Bindungsregion des Klasse-II-Dimers interagiert mit einzelnen Peptidfragmenten des Antigen. Diese Fragmente sind in der Regel zu lang, so daß die nicht von der Bindungstasche des MHC-Klasse-II-Moleküls geschützten Teile der gebundenen Peptide anschließend proteolytisch abgespalten werden. Die mit Peptidfragmenten beladenen Moleküle gelangen schließlich aus den späten Endosomen auf die Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen.

A.5.2. Antigenprozessierung bei MHC-Klasse-I

Die Präsentation intrazellulär synthetisierter Proteine erfolgt durch MHC-Klasse-I-Moleküle. Sie werden im Zytoplasma von Proteasen prozessiert, bevor sie als Peptidfragmente ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden. Die Aufnahme erfolgt durch einen in der ER-Membran lokalisierten Transporterproteinkomplex (TAP; transporter associated with antigen presentation). Im ER-Lumen binden die antigenen Peptidfragmente an die schwere MHC-Klasse-I-Kette. Dies führt zur stabilen Assoziation mit dem β 2-Mikroglobulin und zur Dissoziation von Calnexin, das durch seine Bindung an die MHC-Klasse-I-Kette deren Transport in den Golgi-Apparat verhindert. Das nun mit dem Peptid beladene "fertige" MHC-Klasse-I-Molekül wird anschließend als ternärer Komplex über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und präsentiert das antigene Peptid den zytotoxischen T-Lymphozyten.

A.6. HLA-Klasse-II und Krankheitsassoziation

Die Assoziation der Expression bestimmter HLA-Allele mit diversen Krankheiten ist schon seit drei Jahrzehnten bekannt. Dennoch sind die molekularen Mechanismen, die diese Moleküle bei den einzelnen, vor allem bei den

A. Einleitung

Autoimmunerkrankungen spielen, noch immer nicht vollständig geklärt.

Beim insulinabhängigen Diabetes fand man eine starke Assoziation mit bestimmten Allelen des MHC-Klasse-II-Komplexes. Familien, in denen diese HLA-Haplotypen vermehrt auftraten, zeigten ein erhöhtes Risiko (Thomson, 1984, Svejgaard et al., 1983). Die Beteiligung weiterer Genloci und auch exogener Faktoren ist jedoch nicht zu unterschätzen, da selbst bei eineiigen Zwillingen eine Konkordanz von nur 36% besteht (Thomson et al., 1988).

Die weitaus stärkste Assoziation hängt wohl mit der Expression von HLA-DQ Allelen zusammen, die an Position 57 der kodierten Moleküle keine Asparaginsäure tragen. HLA-DQ's, die an dieser Position eine andere Aminosäure, wie z.B. Valin, Alanin oder Serin exprimieren, forcieren ein Diabetesrisiko, wohingegen die Asparaginsäure Protektion vermittelt (Todd et al., 1987). Die Position 57 des HLA-DQ β Moleküls scheint bei der Bindung eines antigenen Peptids involviert zu sein. Durch die positive Ladung der Aminosäureseitenkette könnte die Interaktion mit einem diabetesassoziierten Epitop verhindert werden, was letztendlich dazu führen würde, daß die für dieses Epitop spezifischen autoreaktiven T-Lymphozyten nicht aktiviert würden (Wucherpfennig und Strominger, 1995).

Die Bedeutung der Aminosäure an der Position 57 der DQ β -Kette zeigt sich auch dadurch, daß sie spezieüberschreitend eine Rolle bei der Diabetesprädisposition spielt. Auch bei den NOD-Mäusen wird die Suszeptibilität durch die Abwesenheit der Asparaginsäure an dieser Position in der DQ β -analogen I-A β -Kette determiniert (Acha-Orbea et al., 1987; Todd et al., 1987). Neuere Befunde deuten darauf hin, daß die Funktion des MHC-Moleküls nicht in der Präsentation eines diabetesspezifischen Peptids zu liegen scheint, sondern im MHC-Molekül selbst. Dieses ist nämlich im Thymus bei der Reifung der T-Zellen involviert und nimmt hier Einfluß auf die Deletion autoreaktiver Thymozyten. In einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, daß bei diabetischen NOD-Mäusen transgene autoreaktive T-Zellen nicht deletiert werden. Diese "Fehlfunktion" konnte jedoch nur in NOD-Mäusen, die die suszeptible DQ β -Kette exprimierten, detektiert werden, nicht aber in solchen, die protektive DQ β -Ketten trugen (Schmidt et al., 1997).

A. Einleitung

Ein starker Zusammenhang besteht auch mit der Expression der Moleküle HLA-DR4 und –DR3. Mehr als 90% der kaukasischen Diabetespatienten sind positiv für DR3 und/oder DR4, im Vergleich zu 45% der Normalbevölkerung (Svejgaard et al., 1980). Dabei müssen jedoch auch die einzelnen Subtypen dieser Moleküle berücksichtigt werden. So prädispositioniert z.B. das HLA-DRB1*0405-kodierte Molekül am stärksten, das DRB1*0406-kodierte Molekül am wenigsten. Wie die Prädisposition über die DR-Moleküle stattfindet, ist bisher jedoch noch weitgehend unklar.

A.7. Zielsetzung der Arbeit

Um präventiv in den Zerstörungsprozeß der β -Zellen durch das Immunsystem eingreifen zu können, müssen die molekularen Mechanismen der Interaktion der hämatopoietischen Zellen mit ihren Zielzellen genau bekannt sein. Vor allem die Antigenerkennung der $CD4^+$ T-Lymphozyten, die hierbei eine initiale Rolle spielen, ist von eklatanter Bedeutung. Im Blut von prädiabetischen und neu-diagnostizierten Patienten findet man B- und T-Zellen, die gegen verschiedene inselzellspezifische Antigene gerichtet sind. Das Hauptantigen scheint die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst GAD-spezifische T-Zelllinien und –klone aus dem peripheren Blut von neu-diagnostizierten Diabetespatienten etabliert werden. Diese sollten anschließend auf molekularer Ebene charakterisiert und analysiert werden. Dabei standen folgende drei Aspekte im Vordergrund:

- Identifizierung des von den T-Zellen erkannten GAD-Epitops
- Charakterisierung des peptidpräsentierenden HLA-Restriktionselement
- Analyse des T-Zellrezeptorrepertoires GAD-spezifischer T-Zellklone verschiedener Diabetespatienten

Die Detektion des GAD-Epitops sollte mit Hilfe einer Serie von Peptiden durchgeführt werden, deren Aminosäuresequenz die gesamte humane GAD-Sequenz abdecken. Ihr jeweiliges Stimulationspotential auf die spezifischen T-Zellen sollten im Proliferationstest überprüft werden.

Das antigenpräsentierende HLA-Molekül, über dessen Restriktion die GAD-Epitoppräsentation erfolgt, sollte in Inhibitionstests definiert werden. Dabei sollte im Proliferationstest die antigenspezifische Stimulation der T-Zellen durch Zugabe verschiedener anti-HLA-Antikörper inhibiert werden. Diese Antikörper waren

A. Einleitung

gegen die einzelnen HLA-Moleküle gerichtet.

Die T-Zellrezeptoranalysen sollten anhand einer semiquantitativen PCR, mit V-gensegmentfamilienspezifischen Primern durchgeführt werden. Die Sequenzierung der einzelnen PCR-Amplifikate sollte der Charakterisierung der, für die Antigenerkennung besonders wichtigen CDR3 Domänen dienen.

B. Material

B.1. Geräte

In der linken Spalte sind Art und Name (*kursiv*) des Geräts aufgeführt, in der rechten der Firmenname des Herstellers.

B.1.1. Allgemeine technische Geräte

Eismaschine <i>AF-30</i>	Scotsman
Glaswaren	
- Duranglasgefäße	Schott
- Pipetten	Hirschmann
Kühlschränke	Bosch
Gefrierschränke	Bosch
Mikropipetten	
- <i>Pipetman P2; P20; P200; P1000;</i>	Gilson
- <i>Varipette 4810 10µl; 100µl; 1000 µl</i>	Eppendorf
- <i>Multipette 4780</i>	Eppendorf
Mischgeräte	
- <i>Vortex-Genie</i>	Scientific Industries
- Rollmischer <i>Mixer 10</i>	Denley
pH-Meter <i>PHM 62</i>	Radiometer
Pipettierhilfe <i>pipetus standard</i>	Hirschmann
Waage	
- <i>Harvard Trip</i>	O'Haus

B.1.2. Technische Geräte für die Zellkultur

Bestrahlungsanlage <i>Gamma Cell 40</i>	Atomic Energy
Durchflußzytometer <i>FACScan</i>	Becton Dickinson
Elektroporationsgerät <i>GenePulser</i>	Biorad
mit <i>Pulse Controller</i> und <i>Capacitor Extender</i>	
Inkubationsschränke	
- <i>B5060</i>	Heraeus
Magnetpartikelkonzentrator <i>MPC-6</i>	Dynal
Mikroskope	
- <i>Labovert</i>	Leitz
- <i>Laborlux D</i>	Leitz
Neubauer Zählkammer	Superior
Sterilwerkbänke	
- <i>LaminAir HBB 2472</i>	Heraeus
- <i>LaminAir ELB 2472</i>	Heraeus
Stickstofftanks	Messer Griesheim
γ-Strahlendetektor <i>Wizard 1480</i>	Wallac
Zentrifugen	
- <i>Rotixa RP</i>	Hettich
- <i>GP Centrifuge</i>	Beckman

B.1.3. Technische Geräte für die Molekularbiologie und Biochemie

DNS-Sequenzierautomat <i>A.L.F.</i>	Pharmacia
Easy Reader	SLT Labinstrument
Elektrophoresekammern, horizontal	
- <i>H4, H5, H6</i>	Gibco BRL
Elektrophoresezubehör	
- Käbme, Abstandshalter	Gibco-BRL
Fluorimager	Vistra
Heizblock <i>Thermostat 5320</i>	Eppendorf
Heizrührer <i>MR82</i>	Heidolph
Inkubationsschrank	
- <i>KB-500</i>	Heraeus
Magnetrührer <i>MR80</i>	Heidolph
Küvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma
Magnetpartikelkonzentratoren <i>MPC-E-1, MPC-M</i>	Dynal
Mikrowelle	Bauknecht
Multilabel Counter (Victor)	Wallac
Säulen	Pharmacia
Schüttelinkubator <i>HT</i>	Infors AG
Schüttler	
- <i>Celloshaker Variospeed</i>	Chemetron
Spannungsgerät <i>2197</i>	Pharmacia-LKB
Spektralfotometer <i>U-3200</i>	Hitachi
Temperaturzyklusautomat <i>OmniGene</i>	Hybaid
UV-Transilluminator (302 nm)	Bachofer
Zentrifugen	
- Ultrazentrifuge <i>L8-70M</i> (Rotor: <i>Ti 70</i>)	Beckman
- Tischzentrifugen <i>5415, 5415 C</i>	Eppendorf
Wasserbäder	
- Kühlwasserbad <i>Multitemp II</i>	LKB
- Wasserbad <i>U3/6A</i>	Julabo
- Wasserbad <i>1003</i>	GFL

B.2. Verbrauchsmaterial für die Zellkultur

B.2.1. Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO) [(CH ₃) ₂ SO]	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat [Na ₂ HPO ₄]	Merck
Ethanol, vergällt [C ₂ H ₅ OH]	Bender&Hobein
Geneticin (G-418 Sulfat)	Gibco-BRL
L-Glutamin [C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃]	Gibco-BRL
Glutaminsäuredecarboxylase GAD	Synectics
Hygromycin B	Boehringer
Interleukin-2, rekombinant	Boehringer
Kaliumchlorid [KCl]	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄]	Merck
Natriumazid [NaN ₃]	Merck
Natriumchlorid [NaCl]	Fluka
Natriumpyruvat [H ₃ C ₃ O ₃ Na]	Serva
Paraformaldehyd (Polyoxymethylen)	Merck
Phytohämagglutinin M (PHA)	Difco
Stickstoff [N ₂]	Messer Griesheim
Streptomycin	Gibco-BRL

B.2.2. Lösungen und Puffer

PBS

- 150 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄

Trypanblaulösung (0,4% (w/v) in physiologischer Saline)

Sigma

B.2.3. Kulturmedien

Ausgangsstoffe für Kulturmedien

RPMI 1640 (mit 2,0 g NaHCO₃/l)

RPMI 1640

RPMI 1640 (+++) 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml Penicillin,

1000 U/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat

DMEM (4,5 g Glucose/l)

Fötale Rinderserum (FBS)

Humanserum

Biochrom

Gibco-BRL

Gibco-BRL

Gibco-BRL

Labor Prof. Schendel

B. Material

Fötales Rinderserum (FBS)

Die Qualität des gelieferten FBS wurde vor Gebrauch getestet, indem es den Kulturmedien verschiedener Zelltypen zugesetzt wurde. Das enthaltene Komplement wurde zuvor durch Inkubation bei 56°C für 45 min inaktiviert.

Humanserum (HS)

Aus dem peripheren Blut unverwandter, männlicher Blutspender wurde das Serum gewonnen, vereinigt, bei 56°C für 45 min inkubiert und in 50 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

T-Zellwachstumsfaktor (TCGF) (Schendel und Wank, 1981)

PBL männlicher Normalspender wurden in RPMI (+++) auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, mit 90 Gy bestrahlt und für 24-36 h mit 1% (w/v) PHA und 1% (v/v) Humanserum kultiviert. Der 0,1µm filtrierte Überstand dieses Ansatzes wurde als T-Zellwachstumsfaktor in einer Konzentration von 7% (v/v) verwendet.

RPMI 1640-Medium (+++)

- 2 mM L-Glutamin
- 1000 U/ml Penicillin
- 1000 U/ml Streptomycin
- 1 mM Natriumpyruvat
- in RPMI 1640 (von Biochrom oder Gibco-BRL)

Kulturmedium für T-Zelllinien

- 10% (v/v) Humanserum
- 15 U/ml Interleukin-2 (IL-2)
- in RPMI 1640 (+++) (Gibco-BRL)

Kulturmedium für T-Zellenklone

- 7% (v/v) T-Zellwachstumsfaktor (TCGF)
- 10% (v/v) Humanserum
- 15 U/ml Interleukin-2 (IL-2)
- in RPMI 1640 (+++) (Gibco-BRL)

Kulturmedium für anhängende L-Zelllinien

- 5% (v/v) FBS
- 1 mg/ml G418
- RPMI 1640 (+++) (Biochrom)

Kulturmedium für EBV transformierte B-Zelllinien (B-LCL)

- 5% (v/v) FBS
- RPMI 1640 (+++) (Biochrom)

Medium für Proliferationstest

- 10% (v/v) Humanserum
- RPMI 1640 (+++) (Gibco-BRL)

Trypsin/EDTA-Lösung

- 0,25% Trypsin (Gibco-BRL) in PBS
- 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat, Titriplex, Merck) pH 8,0

B. Material

B.2.4. Plastikwaren

Kulturflaschen (50 ml/ 250 ml/ 600 ml)	Falcon
<i>Platten</i>	
24-Loch Platten	Falcon
48-Loch Platten	Falcon
96-Loch Flachbodenplatten	Falcon
96-Loch Rundbodenplatten	Nunc
<i>Röhrchen</i>	
Einfrierröhrchen	Nunc
Plastikröhrchen TC (10 ml)	Greiner
Plastikröhrchen (15 ml/ 50 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf

B.2.5. Antikörper

Monoklonale Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die Isotypkontrollen sowie die spezifischen Antikörper bezüglich ihres Isotyps, ihrer Spezifität und Literatur zusammengestellt:

Isotypkontrollen

Antikörper	Isotyp	Quelle
MOPC 21	IgG1	Sigma
UPC10	IgG2a	Sigma
MOPC141	IgM	Sigma

Monoklonale Antikörper gegen HLA-Moleküle

Antikörper	Isotyp	Spezifität	Quelle
L243	IgG2a	pan-HLA-DR	ATCC
2aB8	IgG2a	HLA-DR4	Prof. Dr. R. Wank
DR53 ⁺	IgG2a	HLA-DR53	One Lambda
W6/32	IgG2a	pan-HLA-Klasse I	ATCC

Monoklonale Antikörper gegen T-Zellrezeptoren

Antikörper	Isotyp	Spezifität	Quelle
V α 2	IgG2a	TCRVA-2	Immunotech
V α 2-FITC	IgG	TCRVA-2	Immunotech
V β 2	IgG2a	TCRVB-2	Immunotech

B. Material

FITC- und PE-markierte monoklonale Antikörper gegen T-Zellen

Spezifität	Klon	Markierung	Kombinationen	Firma
CD3		FITC, PE	CD3/CD8; CD3/CD56; CD3/CD4	Immunotech
CD4		FITC	CD4/CD8; CD3/CD4	Immunotech
CD8		FITC, PE	CD3/CD8; CD8/CD56; CD4/CD8	Immunotech

FITC- und PE-markierte Sekundärantikörper

Spezifität	Markierung/Kopplung	Herkunft	Firma
Maus-Immunglobulin	FITC	Kaninchen	Dakopatts (F261)
Maus-Immunglobulin	PE	Ziege	Sigma (A4416)
Maus-Immunglobulin	Magnetpartikel	Ratte	Dynal (M450)
Maus-Immunglobulin	alkalische Phosphatase	Ziege	Amersham

B.2.6. Zellen

HLA-Typisierungen der Diabetespatienten

Patient	Geschlecht	Alter	HLA-DRB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1
6	Männlich	35	0301/0401	0501/0301	0201/0302
40	Weiblich	54	0401/0401	0301/0301	0302/0302
24	Weiblich	43	1501/1601	0102/0102	0602/0502

HLA-Typisierung der T-Zellstimulatorzellen

Die HLA-Typisierungen wurden im Labor von Prof. Dr. R. Wank am Institut für Immunologie der LMU München, durchgeführt. Die periphere Blutlymphozyten wurden vom Kontrollspender 3 (Kp3) regelmäßig neu isoliert. Die restlichen PBL stammen aus dem von Prof. Dr. R. Wank angelegten HLA-Kontroll-Panel.

B. Material

Kontroll-spender	Geschlecht	HLA-DRB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1
Kp3	männlich	0401/0301	0301/0501	0302/0201
Kp20	weiblich	1501/0801	0102/0401	0602/0402
Kp31	männlich	1101/1101	0501/0501	0301/0301
Kp35	weiblich	1501/0301	0102/0501	0602/0201
Kp41	weiblich	1601/0101	0102/0101	0502/0501
Kp51	weiblich	1502/1301	0103/0103	0601/0603
Kp79	weiblich	0701/1301	0201/0103	0201/0603
Kp86	männlich	0701/0101	0201/0101	0201/0501
Kp89	weiblich	0402/1303	0301/0501	0302/0301
Kp95	weiblich	0404/1001	0301/0101	0302/0501
Kp143	männlich	0403/1501	0301/0102	0302/0602
Kp183	männlich	0701/0701	0201/0201	0201/0201

Transfizierte Mausfibroblastenlinien / L-Zellen

Zelle	Charakteristikum	Quelle
BL13	HLA-DRB4*0101-Transfektante	Prof. Dr. Johnson
DAP-3-DR4	HLA-DRB1*0401-Transfektante	Dr. J. Endl

HLA-Typisierung der EBV-transformierten B-Zelllinien

BLCL	HLA-DRB1	HLA-DRB4	HLA-DQA1	HLA-DQB1
BM14	0401/0401	0101/0101	03/03	0302/0302
BOLETH	0401/0401	0101/0101	03/03	0302/0302
MOU	07/07	0101/0101	0201/0201	0201/0201
BER	07/07	0101/0101	0201/0201	0201/0201
DJS	0101/1601	-	0101/0102	0501/0502

B. Material

B.2.7 Peptide

Peptid	Position	Sequenz	MW
1	566-585	ATHQDIDFLIEEIERLGQDL	2356,1
2	556-575	FFRMVISNPAATHQDIDFLI	2336,2
3	546-565	SYQPLGDKVNFRRMVISNPA	2284,1
4	536-555	RMMEYGTTMVSYQPLGDKVN	2321,1
5	526-545	LSKVAPVIKARMMMEYGTTMV	2226,2
6	516-535	LEDNEERMSRSLSKVAPVIKA	2286,0
7	506-525	FWYIPPSLRTLEDNEERMSR	2540,1
8	496-515	DGKPQHTNVCFWYIPPSLRT	2360,1
9	486-505	KNREGYEMVFDGKPQHTNVC	2353,0
10	476-495	ELAEYLYNI IKNREGYEMVF	2495,2
11	466-485	GFEAHVDKCLELAEYLYNI I	2341,1
12	456-475	WLMWRAGTTGFEAHVDKCL	2350,1
13	446-465	CGRHVDVFKLWLMWRAGTT	2405,5
14	436-455	SYDTGDKALQCGRHVDVFKL	2253,1
15	426-445	LFQQDKHYDLSYDTGDKALQ	2386,2
16	416-435	QNCNQMHASYLFQQDKHYDL	2484,3
17	406-425	ALLVREEGLMQNCNQMHASY	2308,1
18	396-415	KMMGVPLQCSALLVREEGLM	2206,2
19	386-405	RANSVTWNPHKMMGVPLQCS	2257,1
20	376-395	KHKWKLSGVERANSVTWNPH	2375,3
21	366-385	AWGGLLMSRKHKWKLSGVE	2241,4
22	356-375	KYKIWMHVDAAWGGLLMSR	2320,5
23	346-365	PLLAVADICKKYKIWMHVDA	2315,4
24	336-355	AGTTVYGAFDPLLAVADICK	2025,8
25	326-345	GFVPFLVSATAGTTVYGAFD	2020,8
26	316-335	ERRILEAKQKGFVPFLVSAT	2290,2
27	306-325	ERGMIPSDLERRILEAKQK	2398,2
28	296-315	TDSVILIKCDERGMIPSDL	2234,0
29	286-305	KKGAAALGIGTDSVILIKCD	1973,9
30	276-295	FTSEHSHFSLKKGAAALGIG	2058,9
31	266-285	GMAALPRLIAFTSEHSHFSL	2186,0
32	256-275	FKMFPEVKEKGMALPRLIA	2277,2
33	246-265	SNMYAMMIARFKMFPEVKEK	2452,3
34	236-255	DGIFSPGGAISNMYAMMIAR	2102,9
35	226-245	EIIGWPGGSGDGIFSPGGAI	1887,7
36	216-235	LEYVTLKKMREIIGWPGGSG	2232,0
37	206-225	TYE IAPVFV LLEYVTLKKMR	2412,0
38	196-215	LTSTANTNMFTYE IAPVFVL	2232,5
39	186-205	LDMVGLAADWLTSTANTNMF	2171,5
40	176-195	PRYFNQLSTGLDMVGLAADW	2254,7
41	166-185	TLKYAIKTGHPRYFNQLSTG	2295,7
42	156-175	LEEILMHCQTTLKYAIKTGH	2329,8
43	146-165	NWELADQPQNLEEILMHCQT	2412,7
44	136-155	HYPNELLQEYNWELADQPQN	2501,7
45	126-145	FDRSTKVIDFHYPNELLQEY	2514,8
46	116-135	NILLQYVVKSFDRSTKVIDF	2386,0

B. Material

Peptid	Position	Sequenz	MW
47	106-125	PTLAFLQDVMNILLQYVVKS	2293,0
48	96-115	DLLPACDGERPTLAFLQDVM	2204,5
49	86-105	DVNYAFLHATDLLPACDGER	2220,4
50	76-95	DQKPCSCSKVDVNYAFLHAT	2226,5
51	66-85	AAARKAACACDQKPCSCSKV	2011,2
52	56-75	AESGGSQPPRAAARKAACAC	1902,0
53	46-65	ALLYGDAEKPAESGGSQPPR	2043,2
54	36-55	FTGGIGNKLCALLYGDAEKP	2067,4
55	26-45	ARAWCQVAQKFTGGIGNKLC	2151,7
56	16-35	GSGDSENPGTARAWCQVAQK	2062,3
57	06-25	SGFWSFGSEDGSGDSENPGT	2020,0
58	1-15	MASPGSGFWSFGSED	1561,6

Die GAD-Peptide wurden im Labor von Prof. Dr. Günther Jung an der Universität in Tübingen synthetisiert.

B.3. Verbrauchsmaterial für die Molekularbiologie und Biochemie

In der linken Spalte ist der Name des Materials aufgeführt, in der rechten der Firmenname des Herstellers.

B.3.1. Chemikalien

In runden Klammern ist die Abkürzung bzw. Alternativbezeichnung, in eckigen Klammern die Summenformel der jeweiligen Chemikalie angegeben. Die Chemikalien für die Erstellung eines Polyacrylamidgels zur Auftrennung fluoreszeinkennzeichneter DNA-Sequenzierungsansätze sind mit (A.L.F.) gekennzeichnet.

Acrylamid [C ₃ H ₅ NO] (z. E.)	BioRad
Acrylamid-/Bisacrylamidgemisch 19:1 bzw. 29:1 (A.L.F.)	BioRad
Agarosen	
- <i>NuSieve 3:1 Agarose</i>	FMC
- <i>Typ II Medium EEO</i>	Sigma
Ammoniumacetat [NH ₄ COO]	Merck
Ammoniumpersulfat (APS) [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	Merck, Pharmacia
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Borsäure [H ₃ BO ₃] (A.L.F.)	Pharmacia
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform [H ₃ CCl]	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC) [C ₆ H ₁₀ O ₅]	Sigma
Di-Kaliumhydrogenphosphat [K ₂ HPO ₄]	Merck
N,N' Dimethylformamid [HCON(CH ₃) ₂]	Merck
1,4-Dithiothreitol (DTT) [C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂]	Sigma
Essigsäure, 100% (Eisessig) [CH ₃ COOH]	Merck
Ethanol [C ₂ H ₅ OH]	Merck
Ethanol, vergällt [C ₂ H ₅ OH]	Bender&Hobein
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll, Typ 400	Sigma
Formaldehyd, 37% [HCHO]	Merck
Formamid [HC(NH ₂)O]	Gibco-BRL
Glycerin, ca. 87% [C ₃ H ₈ O ₃]	Merck
Harnstoff [CH ₄ N ₂ O] (A.L.F.)	Pharmacia
Kaliumacetat [CH ₃ COOK]	Merck
Kaliumchlorid [KCl]	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat [KH ₂ PO ₄]	Merck
Natriumacetat [CH ₃ COONa]	Merck
Natriumchlorid [NaCl]	Fluka
Natriumhydrogencarbonat [NaHCO ₃]	Merck
Natronlauge, 1 M [NaOH]	Merck
Phenol, Tris gesättigt [C ₆ H ₅ OH]	Biomol
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma
2-Propanol (Isopropanol) [C ₃ H ₇ OH]	Merck
D-(+)-Saccharose (Sucrose)	Merck
Salzsäure, 37% [HCl]	Merck
Salzsäure, 1M [HCl]	Merck
N,N,N',N' Tetramethylenethyldiamin (TEMED) [C ₆ H ₁₆ N ₂]	Sigma, Pharmacia
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) [C ₄ H ₁₁ NO ₃]	Sigma, USB
Xylencyanol	Sigma

B. Material

Nukleotide

Desoxyadenosintri-phosphat (dATP)	Pharmacia
Desoxycytidintri-phosphat (dCTP)	Pharmacia
Desoxyguanosintri-phosphat (dGTP)	Pharmacia
Desoxythymidintri-phosphat (dTTP)	Pharmacia
Fluoreszein-Desoxyadenosintri-phosphat (F-dATP) (A.L.F.)	Pharmacia

Radioaktive Chemikalien

^3H -Thymidin (5mCi/ml)	DuPont NEN
----------------------------------	------------

B.3.2. Lösungen, Puffer und Medien

B.3.2.1. Universelle Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

TE

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA

10xTBE

- 0,89 M Tris
- 0,89 M Borsäure
- 0,02 M EDTA

50xTAE

- 2 M Tris
- 0,05 M EDTA
- mit Eisessig auf pH 8,0

B.3.3. Enzyme

DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i> (Taq)	Pharmacia
Reverse Transkriptase von Rous-assoziiertem Virus-2 (RAV-2)	Amersham
Ribonukleaseninhibitor (RNasin)	Promega

B.3.4. Versuchssysteme ("Kits")

DNA-Sequenzierungssystem für A.L.F. (<i>AutoRead</i>)	Pharmacia
Lösung zur RNA-Präparation (<i>RNAzol B</i>)	Cinna/Biotech
DELFI A Europium-Labeling Kit	Wallac

B.3.6. Oligonukleotide

B.3.6.1. Oligonukleotide für die TCR-V α PCR

TCR-V α gensegmentfamilienspezifische Oligonukleotide (5')

V α 1	5' CTGAGGTGCAACTACTCA 3'
V α 1.1	5' AGAGCCCAGTCRGTGACCCAG 3'
V α 2	5' GTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCC 3'
V α 3	5' GGTGAACAGTCAACAGGGAGA 3'
V α 4	5' ACAAGCATTACTGTACTCCTA 3'
V α 5	5' GGCCCTGAACATTCAGGA 3'
V α 6	5' GTCACCTTCTAGCCTGCTGA 3'
V α 6N	5' GGTCACAGCTTCACTGTGGCTA 3'
V α 7	5' AGGAGCCATTGTCCAGATAAA 3'
V α 8	5' GGAGAGAATGTGGAGCAGCATC 3'
V α 9	5' ATCTCAGTGCTTGTGATAATA 3'
V α 10	5' ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT 3'
V α 11	5' AGAAAGCAAGGACCAAGTGTT 3'
V α 12	5' CAGAAGGTAACCTCAAGCGCAGACT 3'
V α 13	5' GAGCCAATTCCACGCTGCG 3'
V α 14	5' CAGTCTCAACCAGAGATGTC 3'
V α 15	5' GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC 3'
V α 16	5' TCAGCGGAAGATCAGGTCAAC 3'
V α 17	5' GCTTATGAGAACACTGCGT 3'
V α 18	5' GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT 3'
V α 19	5' AGAACCTGACTGCCCAGGAA 3'
V α 20	5' CATCTCCATGGACTCATATGA 3'
V α 21	5' GACTATACTAACAGCATGT 3'
V α 22	5' TACACAGCCACAGGATACCCTTCC 3'
V α 23	5' TGACACAGATTCCTGCAGCTC 3'
V α 24	5' GGAGGGAAAGAAGTGCCTCTT 3'
V α 25	5' ATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTA 3'
V α 26	5' AGAGGGAAAGAATCTCACCATAA 3'
V α 27	5' ACCCTCTGTTCCCTGAGCATG 3'
V α 28	5' CAAAGCCCTCTATCTCTGGTT 3'
V α 29	5' AGGGGAAGATGCTGTCACCA 3'
V α 30	5' GAGGGAGAGAGTAGCAGT 3'
V α 31	5' GAGGGAGCATCTGTGACTA 3'
V α 32	5' CAAATTCCTCAGTACCAGCA 3'

Oligonukleotid (5') für die TCR-C α Kontroll-PCR

P-5' α ST 5' CTGTGCTAGACATGAGGTCT 3'

Oligonukleotid (3') für die TCR-C α Kontroll-PCR

P-3' α ST 5' CTTGCCTCTGCCGTGAATGT 3'

B. Material

(Sequenzen von V α 1 bis V α 12, V α 17 bis V α 21 und T-C α nach Davies et al., 1991. Dort sind allerdings V α 17 bis V α 21 als V α 13 bis V α 17 nach einer veralteten Nomenklatur benannt; die in Kap. D1 identifizierten V α -Gensegmente sind bereits nach der neuen Nomenklatur benannt.)

B.3.6.2. Oligonukleotide für die TCR-V β PCR

TCR-V β gensegmentfamilienspezifische Oligonukleotide (5')

V β 1	5' GCACAACAGTTCCCTGACTTGAC 3'
V β 2	5' TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT 3'
V β 3	5' GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC 3'
V β 4	5' ACATATGAGAGTGGATTTGTCATT 3'
V β 5.1	5' ATACTTCAGTGAGACACAGAGAAAC 3'
V β 5.2/5.3	5' TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG 3'
V β 6.1	5' GCCCAGAGTTTCTGACTTACTTC 3'
V β 6.2	5' ACTCTGASGATCCAGCGCACA 3'
V β 6.3	5' ACTCTGAAGATCCAGCGCACA 3'
V β 7	5' CCTGAATGCCCAACAGCTCTC 3'
V β 8	5' ATTTACTTTAACAACAACGTTCCG 3'
V β 8S3	5' GCTTACTTCCGCAACCGGGCTCCT 3'
V β 9	5' CCTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC 3'
V β 10	5' CTCCAAAACATCCTGTACCTT 3'
V β 11	5' TCAACAGTCTCCAGAATAAGGACG 3'
V β 12	5' AAAGGAGAAGTCTCAGAT 3'
V β 12S3	5' GCAGCTGCTGATATTACAGAT 3'
V β 13	5' TCGACAAGACCCAGGCATGG 3'
V β 13.1	5' CAAGGAGAAGTCCCAAT 3'
V β 13.2	5' GGTGAGGGTACAACCTGCC 3'
V β 13S5	5' ATACTGCAGGTACCACTGGCA 3'
V β 14	5' GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAAT 3'
V β 15	5' AGTGTCTCTCGACAGGCACAGGCT 3'
V β 16	5' AAAGAGTCTAAACAGGATGAGTCC 3'
V β 17	5' CAGATAGTAAATGACTTTTCAG 3'
V β 18	5' GATGAGTCAGGAATGCCAAAGGAA 3'
V β 19	5' CAATGCCCAAGAACGCACCCTGC 3'
V β 20	5' AGCTCTGAGGTGCCCCAGAATCTC 3'
V β 21	5' AAAGGAGTAGACTCCACTCTC 3'
V β 22.1	5' CATCTCTAATCACTTATACT 3'
V β 22.2	5' AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCA 3'
V β 22.3	5' CTCAGAGAAGTCTGAAATATTTCG 3'
V β 23	5' TATCCCTAGACACGACACTG 3'
V β 24	5' GACTTTGAACCATAACGTCA 3'

B. Material

Oligonukleotid (5') für die TCR-C β Kontroll-PCR

P-5' β ST 5' AAGCAGAGATCTCCCACAC 3'

Oligonukleotid (3') für die TCR-C β Kontroll-PCR

P-3' β ST 5' GAGGTAAAGCCACAGTTGCT 3'

(Sequenzen von V β 1 bis V β 20 und 3'C β nach Choi et al., 1989. Für die Detektion der Mitglieder der TCRBV5 und TCRBV13 Gensegmentfamilien werden jeweils zwei verschiedene Oligonukleotide eingesetzt.)

B.3.6.3. Oligonukleotide für die Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung mit A.L.F. wurden 5' fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet (F-X).

Primer für TCR- α -Kette 5' GTACACGGCAGGGTCAGGGTT 3'

Primer für TCR- β -Kette 5' CAGCGACCTCGGGTGGGAACA 3'

B.3.7. Sonstige Nukleinsäuren

Hefe tRNA

Boehringer

Molekulargewichtsmarker für die DNA-Agarosegelelektrophorese (1kb Leiter/Fragmentgrößen (in bp): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1635, 1018, 516, 506, 398, 344, 298, 220, 200, 154, 142, 75)

Gibco-BRL

B.3.8. Sonstige Materialien

Glaswaren

Objektträger, Deckgläser
Pasteurpipetten (kurz/lang)

Menzel-Gläser
WU Mainz

Magnetpartikel, streptavidingekoppelt (M-280)

Dynal

pH Spezialindikatoren

Merck

Sterilfilter

Nyl (150 ml)

Nalgene

B.4. Firmenverzeichnis

Im folgenden sind die Firmen aufgeführt, von denen Material bezogen wurde (bei ausländischen Firmen ist auch der Name und der Ort der deutschen Vertriebsfirma bzw. der Ort der deutschen Filiale in Klammern angegeben).

Agfa-Gevaert, Leverkusen
Amersham, Little Chalfont, England (Braunschweig)
ATCC, Rockville, Maryland, USA
Beckman, Palo Alto, Kalifornien, USA (München)
Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA (Heidelberg)
Berthold, München
Biomol, Hamburg
Biochrom, Berlin
BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA (München)
Boehringer, Mannheim
Cetus, Emeryville, Kalifornien, USA
Costar, Cambridge, Massachusetts, USA
Coulter,
Dakopatts, Hamburg
DuPont Instruments, Wilmington, Delaware, USA (Bad Homburg)
Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA (Stuttgart)
Dynal, Oslo, Norwegen (Hamburg)
Eppendorf, Hamburg
Falcon, Oxnard, Kalifornien, USA
Fluka, Buchs, Schweiz
Genzentrum, Martinsried
Gibco-BRL (Bethesda Research Laboratories) Gaithersburg, Maryland, USA (Eggenstein)
Greiner, Nürtingen
Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich (Abimed, Langenfeld)
Heraeus, Hanau
Hettich, Tuttlingen
Hoechst, Frankfurt
Hybaid, Teddington, UK (MWG, Ebersberg)
Leitz, München
LKB, Bromma, Schweden
Merck, Darmstadt
Nalgene, Rochester, New York, USA (Heidesheim)
One Lambda, Krefeld
Pharmacia, Uppsala, Schweden, (Freiburg)
Revco, Asheville, North Carolina, USA
Sarstedt, Nümbrecht
Schleicher&Schüll, Dassel
Serva, Heidelberg
Sigma, St. Louis, Missouri, USA (Deisenhofen)

C. METHODEN

C.1. Methoden der Zellkultur

C.1.1. Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL)

Aus 10-30 ml heparinisiertem Vollblut wurden Lymphozyten und Makrophagen mittels Dichtegradientenzentrifugation steril isoliert. Dazu wurde das Blut auf das doppelte Volumen mit RPMI 1640 verdünnt und in 30 ml-Portionen über 15 ml Ficoll (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Nach der anschließenden Zentrifugation von 25 min bei 500 x g befanden sich Erythrozyten und Granulozyten im Sediment unterhalb des Ficolls und die mononukleären Zellen in der Interphase zwischen Ficoll (mittlere Schicht) und Blutplasma (oberste Schicht). Der milchigweiße Lymphozytenring wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen, in neue 50 ml-Zentrifugationsgefäße transferiert und nach Suspension in PBS bei 300 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrittes wurden die Lymphozyten in entsprechendem Medium resuspendiert und gezählt. Neben den Lymphozyten erhielt man auch die für die Antigenpräsentation wichtigen Monozyten bzw. dendritischen Zellen (DC).

C.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Aus der Zellsuspension wurden 50 µl steril entnommen, mit dem selben Volumen Trypanblau gemischt und in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Aus den Zahlen der lebendigen Zellen der beiden ausgezählten Großquadrate, bestehend aus jeweils 16 Kleinquadraten, wurde der Mittelwert berechnet und mit 1×10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert, wodurch sich die Zellzahl pro ml ergab.

C.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

C.1.3.1. Einfrieren

Zur Langzeitlagerung müssen Zellen mit einem Gefrierschutzmittel eingefroren werden, das die Kristallisation des intrazellulären Wassers verhindert und so die Zellmembranen vor der Zerstörung durch die wasserbedingte Volumenzunahme schützt. Dimethylsulfoxyd

(DMSO) kann zwar die Wasserkristallisation verhindern, ist für die Zellen bei RT allerdings toxisch, weshalb der Einfriervorgang bei 4°C durchgeführt werden mußte. Der auf 1-20x10⁶ Zellen/ml/Ampulle in 100% FBS eingestellten Zellsuspension wurde das selbe Volumen 20% DMSO/80% RPMI1640 zugesetzt und 1 ml-Aliquots zunächst bei -80°C eingefroren, bevor die Ampullen zu ihrer Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt wurde.

C.1.3.2. Auftauen

Die Ampullen wurden zügig im 37°C-Wasserbad aufgetaut und in 50%ige FBS/RPMI1640-Medium transferiert. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI1640-Medium wurden die Zellen erneut gezählt und in entsprechendem Medium resuspendiert.

C.1.4. Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit Phytohämagglutinin

Die PBL wurden in 15% humanserumhaltigem Medium (RPMI1640 +++) auf 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt, in 75 cm³ Kulturflaschen transferiert und mit ca. 13 µg PHA/ml Zellsuspension für 6 Tage im Brutschrank bei konstanten Bedingungen (37°C, 6% CO₂) stimuliert.

C.1.5. Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien

Die T-Zelllinien wurden mit Hilfe des Splitt-Well-Verfahrens (Pette et al., 1990) etabliert. Durch Stimulation von PBL verschiedener Diabetespatienten mit nativer humaner GAD65 konnten CD4-positive T-Helfer Zellen generiert werden. Dazu wurden die PBL auf 1x10⁶ Zellen/ml RPMI-Medium, supplementiert mit 10% Humanserum, eingestellt, die GAD in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben und in einer 96-Lochplatte 100.000 bis 200.000 Zellen pro Loch kultiviert. Nach vier Tagen und alle weiteren zwei Tage wurde IL-2 in einer Endkonzentration von 15 U/ml zugegeben. Am Tag 14 wurden die Zellen restimuliert, die eine deutliche Proliferation zeigten.

C.1.6. Restimulation der T- Helfer Zellen

Um T-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur halten zu können, müssen sie in regelmäßigen Abständen mit antigenpräsentierenden Zellen restimuliert werden. Bei den GAD-spezifischen TCL erwies sich eine 14-tägige Restimulationsperiode als am günstigsten.

Die T-Zellen wurden 2 mal mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen eines Lochs auf zwei Loch einer neuen Platte gesplittet. Eines dieser beiden wurde mit bestrahlten PBL stimuliert, die zuvor eine Stunde mit GAD65 (10µg/ml) inkubiert worden waren, zum anderen Loch wurden bestrahlte PBL zugegeben, die kein Antigen präsentierten. Die PBL wurden in beiden Fällen in einer Konzentration von $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml, das hieß bei 50µl dieser Zellsuspension, 80.000 Zellen pro Loch, zu den T-Zellen gegeben. Bei späteren Restimulationszyklen, wenn bereits mehr T-Zellen vorhanden waren, wurden diese nach dem Waschen auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt, was beim Aussäen in die Platte 20.000 Zellen/100µl/Loch ergab.

C.1.7. Klonierung GAD-spezifischer T-Zellklone aus den polyklonalen Linien

Zur Separation der GAD-spezifischen T-Zellen, die in den polyklonalen Linien enthalten waren, wurden durch limitierte Verdünnungskulturen Klone generiert. Dazu wurden 30.000 bestrahlte Stimulatorzellen (PBL mit 40 Gy) pro Loch einer 96-Loch-Rundbodenplatte in einem Volumen von 100 µl RPMI +++ ausgesät und verschiedene Konzentrationen an T-Zellen zugegeben: 10 Zellen/ 100 µl, 3 Zellen/ 100 µl, 1 Zelle/ 100 µl bzw. 0.3 Zellen/ 100 µl. Nach 9-10 Tagen wurden die Zellen im Mikroskop nach ihrem Wachstum beurteilt und wachstumsintensive Klone in neue 96-Loch-Platten transferiert und ggf. restimuliert. Klone wurden durch einen einheitlichen Zelltyp und z.T. durch Nachweis eines einzigen T-Zell-Rezeptors (TCR) charakterisiert.

C.1.8. Proliferationstest

Zur Quantifizierung der T-Zellproliferation wurden die T-Zellen zwei mal mit Medium gewaschen und mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro 50 µl in eine 96-Loch Rundbodenplatte ausgesät. Die zuvor mit nativer GAD, bzw. mit den zu testenden GAD-Peptiden für zwei Stunden inkubierten, bei 4000 rad bestrahlten PBL wurden in einer Zelldichte von 80.000 Zellen pro 50 µl zu den T-Zellen gegeben (analog zur

C. METHODEN

Restimulation). Nach 72 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde mit 1 µCi 3H-Thymidin gepulst und nach 16 h Inkubation die eingebaute Radioaktivität im Betacounter gemessen. Der Stimulationsindex (SI) berechnet sich aus dem Quotient der Höhe des 3H-Thymidin-Einbaus in Anwesenheit von Antigen und dessen Einbau ohne Antigenpräsenz. Nur Stimulationsindices mit einem Wert von mehr als 3 wurden als signifikant angesehen.

C.1.9. Antikörper-Inhibitions Test

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener HLA-Moleküle auf das Stimulationsverhalten der T-Zellen wurden anti-HLA-Antikörper im Proliferationstest eingesetzt.

Hierfür wurden die HLA-spezifischen mAk in verschiedenen Konzentrationen mit den, auf eine Zelldichte von 80.000 Zellen pro 50 µl eingestellten PBL, für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µg/ml der antigenen Peptide zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Nach dem Bestrahlen bei 4000 rad wurden die PBL zu den gewaschenen und auf 10.000 Zellen pro 50 µl eingestellten T-Zellen in eine 96-Loch Rundbodenplatte gegeben. Nach 72 h Inkubation bei 37°C/5% CO₂ wurde mit 3H-Thymidin gepulst und die eingebaute Radioaktivität nach 16 h im Betacounter gemessen.

C.1.10. Bestimmung der TNF- α Sekretion im zellulären Test

Zur Bestimmung der TNF- α Sekretion wurden die T-Zellen in einer 96 Loch-Rundbodenplatte mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well ausgesät und mit je 80.000 bestrahlten PBL, die zuvor mit Antigen inkubiert worden waren, stimuliert. Als Kontrolle wurden je 2 Loch mit PBL stimuliert, die kein Antigen präsentierten. Nach 24 h wurde Kulturüberstand entnommen und der TNF- α Gehalt bestimmt.

Die sekretierte TNF- α Menge wurde durch Messung der Zytotoxizität des Kulturüberstands gegen WEHI 164 Klon 13 bestimmt. WEHI 164 Zellen wurden in unbehandelten Petrischalen in 10 ml WEHI-Medium (RPMI 1640 mit Glutamin und 10% FCS) kultiviert. Am Tag 3-4 nach der letzten Passagierung wurden die Zellen auf eine Dichte von 2×10^5 Zellen eingestellt. Am nächsten Tag wurden sie geerntet, gezählt und auf eine Zelldichte von $2,4 \times 10^4$ Zellen / 40 µl in WEHI-Medium, das mit 2 µg/ml Actinomycin D supplementiert war, eingestellt. Je 40 µl der Kulturüberstände der T-Zell-Stimulationsplatte wurden auf eine 96 Loch -Flachbodenplatte übertragen und mit 40 µl der WEHI-Suspension vermischt. Jede Mikrotiterplatte trug eine rTNF- α Standard-

Titration mit 2000 pg/ml und absteigender fünffacher Verdünnungsreihe. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C / 6,5% CO₂ im Brutschrank wurden 10 µl MTT-Lösung (10 mg/ml in PBS) zu jedem Loch gegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden 75 µl einer 10%igen SDS-Lösung pro Loch zupipetiert. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurde die Überlebensrate anhand der sich entwickelten blauen Farbintensität am Photometer bei 550 nm bestimmt.

C.1.11. Separation von Subpopulationen durch magnetpartikelgekoppelte monoklonale Antikörper

Zur Trennung der V α 2- und V α 21-TCR-Ketten tragenden T-Zellen, wurden die beiden Subpopulationen mittels magnetischer Partikel in indirekter Methode depletiert.

Zur Trennung der TCR-V α 2 und V α 21-Zellen wurden 1-3x10⁶ Effektorzellen nach Zentrifugation (300 g, 4 min, RT) in 100 µl PBS in 10 ml-Röhrchen resuspendiert und zunächst mit 50 µl eines löslichen mAk gegen TCR-V α 2 (Konzentration 1 mg/ml; Coulter) für 90 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden zu 100 µl Effektorzellen (in PBS resuspendiert) 100 µl mit Antikörpern (Ziege- α Maus-IgG) beschichtete magnetische Partikel (M450, Dynal AS, Oslo, Norwegen) im Verhältnis Magnetpartikel/Zellen 4:1, zugegeben und für 30 min bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Bindung der Ak-beladenen Partikel an die Fc-Teile des TCR-V α 2-Primärantikörpers ermöglichte nun die Separation der TCR-V α 2 und -V α 21-Zellen durch Magnetfixierung an der Röhrchenwand. Im Magnetständer wurden die an die Partikel gebundenen TCR-V α 2-Zellen an der Röhrchenwand fixiert, während die nicht gebundenen TCR-V α 21-Zellen in einem separaten Röhrchen gesammelt wurden. Nach dreimaliger Resuspension in PBS mit anschließender Magnetbindung wurde die gesammelte Negativfraktion separat von der Positivfraktion kultiviert und die Reinheit der Trennung am Durchflußzytometer kontrolliert. Die Positivfraktionen wurden mit den gebundenen Partikeln kultiviert, die sich nach 2-3 Tagen wieder von den Zellen ablösten.

C.1.12. Kultivierung und Passagierung adhärenter Zellen

Die adhärent wachsenden Mausfibroblastenlinien (L-Zellen) wurden von einer auf zwei oder drei Kulturflaschen verteilt, wenn die Bodenfläche ca. 80-100% von dem Zellrasen bedeckt war; dies entspricht einer Kulturpassage. Das Medium wurde vollständig

C. METHODEN

abgesaugt und der Zellrasen mit PBS abgespült, um das trypsininhibierende FBS zu entfernen. Zur Ablösung als Einzelzellsuspension, wurde der Zellrasen mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und der Ablösungsvorgang nach ca. 2-5 min durch Zugabe FBS-haltigen Mediums abgesoppt. Die Einzelzellsuspension kann nun auf die neuen Kulturflaschen verteilt und mit frischem Medium versehen werden. Die Inkubationsbedingungen im Brutschrank sind, identisch mit allen anderen Zellen, 6% CO₂ bei 37°C.

C.1.13. Kultivierung EBV-transformierter B-Zelllinien

Lymphoblastoide B-Zelllinien (B-LCL) sind humane B-Zellen, die durch das Epstein-Barr-Virus-Genom transformiert und damit immortalisiert wurden. Diese B-LCL wurden in 5% FBS-enthaltendem RPMI1640-Medium, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat, in einer Dichte von 0,2-1,0x10⁶ B-Zellen/ml kultiviert.

C.1.14. Analyse der Oberflächenantigene mittels Durchflußzytometrie am fluoreszenzaktivierten Zellseparator (FACScan)

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden gezählt, auf 1-1,5x10⁶ Zellen/ml PBS eingestellt und in 100 µl-Volumina in die 96-Loch-Platten pipettiert. Nach Zentrifugation (300 g, 4 min, RT) wurden die Zellen in 40 µl des jeweiligen Primärantikörpers (Hybridomüberstand bzw. gereinigter mAk) resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit 50 µl des Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)- oder Phycoerythrin (PE)-markierten Sekundär-antikörpers (Ziege-?Maus-Ig bzw. Kaninchen-?Maus-Ig) in einer 1:50-Verdünnung resuspendiert und für 30 min im dunklen auf Eis exponiert. Nach wiederholtem waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS/1%PFA fixiert und im FACScan gemessen.

C.2. Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Methoden entsprechend den Protokollen molekularbiologischer Handbücher (Current Protocols in Molecular Biology, Maniatis et.al. 1982) durchgeführt.

C.2.1. RNA-Isolation aus T-Zelllinien

Zur Isolation der RNA aus den GAD-sezifischen T-Helferzellen zur Bestimmung des T-Zellrezeptorrepertoires wurde nach dem RNazol-Protokoll (WAK-Chemie) gearbeitet. Um eine Kontamination mit den ubiquitär vorkommenden RNasen zu vermeiden, wurden alle Verbrauchsmaterialien autoklaviert und alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Verdünnung 1:1000) bei 37°C für 12 h inkubiert und autoklaviert.

Die Zellen wurden nach dem Waschen in PBS abzentrifugiert (300 g, 4 min, RT) und sofort auf Eis in 200 µl RNazol/1x10⁶ Zellen homogenisiert. Bei Zellzahlen unter 1x10⁶ wurde nach der RNazol-Zugabe 10 µg Hefe-t-RNA zugesetzt, um die RNA-Gesamtmenge zu erhöhen und dadurch den Verlust der zu isolierenden RNA zu verringern. Dem Homogenisat wurde dann 1/10 Volumen (20 µl/1x10⁶ Zellen) Chloroform zugegeben, auf dem Vortex 15 sec gut gemischt und für 5 min auf Eis plaziert. Die Suspension wurde durch die anschließende Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) in die untere, proteinhaltige Phenol-Chloroformphase und in die obere, RNA-haltige wäßrige Phase getrennt. Dem quantitativen Transfer dieser wäßrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß folgte das Ausfällen der RNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol für 15 min auf Eis. Die RNA ließ sich durch Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) präzipitieren und nach Abkippen der Flüssigkeit und Waschen in 75%igem Ethanol (Zentrifugation bei 12000 g, 15 min, 4°C) in 100 µl H₂O-DEPC lösen.

C.2.2. Fällung von RNA

Durch erneutes Ausfällen der RNA konnte ein höherer Reinheitsgrad und damit eine höhere Effizienz der nachfolgenden Reaktionen erreicht werden.

Für die Fällung wurde der in 100 µl H₂O-DEPC gelösten RNA zur Erhöhung der Salzkonzentration 1/10 Volumen 2 M NaCl-Lösung und für das eigentliche Ausfällen 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugesetzt. Der Zeitrahmen für die Fällreaktion bei -20°C war variabel zwischen 1-24 h, wonach die RNA durch Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C)

pelletiert wurden. Nach Waschen mit 200 µl 75% EtOH und erneuter Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4°C) wurde das Pellet getrocknet und in 20-40 µl H₂O-DEPC bzw. 30 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

C.2.3. Auftrennung der PCR-Amplifikate durch horizontale

Agarosegelelektrophorese

Da die Auftrennung der PCR-Amplifikate sowohl von deren Länge, als auch von der Polymerisationsdichte der Agarose abhängig ist, wurden je nach der Länge der erwarteten Fragmente Gele mit einem Agarosegehalt zwischen 1%-3,5% hergestellt. Die Agarose wurde in einem entsprechenden Volumen 1xTAE-Puffer durch 2-3 min Kochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (ca. 20 µg EB/100 ml) versetzt und in ein gekühltes Gelbett mit Kamm für die Auftragstaschen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel so in die Elektrophoresekammer überführt, daß das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Die aufzutragenden Proben (ca. 15-20 µl) sowie ein DNA-Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter) wurden mit 1/10 Volumen des bromphenolblauhaltigen Farbpuffers versetzt und quantitativ in die Taschen überführt.

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in einem Spannungsfeld bei 100 Volt für ca. 1-2 h, wonach die Banden unter der UV-Lampe visuell detektiert und ggf. mit einer Polaroidkamera fotografiert wurden.

Seit Dezember 1995 stand ein "Fluoroimager" (Molecular Dynamics) zur Verfügung, mit dessen Hilfe die ethidiumbromidgefärbten Agarosegele eingelesen und die Bandenmuster als Abbild des ursprünglichen Gels gespeichert werden konnten. Diese elektronische Verarbeitung der Information aus den Gelen ermöglichte auch eine quantitative Analyse der relativen Bandenintensitäten.

C.2.4. Reverse Transkription von RNA

Zur cDNA-Synthese wurde zunächst 5 µl RNA-Lösung (ca. 10 µg) mit 10 pmol des spezifischen Oligonukleotids (C?ST bzw. C?ST), 4 µl H₂O und 20 U RNAsin für 10 min bei 55°C erhitzt, um eventuell vorhandene Tertiärstrukturen aufzuheben. Danach erfolgte die Zugabe des Reaktionsmixes aus 38 µl RAV-2-Puffer/DTT und 1 µl RAV-2-Enzym (18 U) sowie die Inkubation des Ansatzes bei 42°C für 90 min. Zur Inaktivierung der RAV-2-Reversen Transkriptase wurde das RNA-cDNA-Gemisch anschließend für 5 min bei

65°C inkubiert und bei -80°C gelagert.

Reaktionspuffer (Arbeitskonzentration in 50 µl Reaktionsvolumen):

- 50 mM Tris-HCl pH 8,3
- 50 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 3 mM DTT
- 0,1% Nonidet P-40
- 250 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

C.2.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion konnten definierte DNA-Abschnitte aus cDNA-Präparationen mit Hilfe genspezifischer Oligonukleotide sowie der thermostabilen Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) so amplifiziert werden, daß sie durch Agarosegelelektrophorese detektierbar waren (nach Lundberg et al., 1991).

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema in 50 µl Volumina angesetzt, wobei Variationen nur durch den Einsatz unterschiedlicher Primer entstanden:

PCR-Ansatz (Endkonzentrationen):

- 3'-Primer (10 pmol; 0,5-1µM)
- 5'-Primer (10 pmol; 0,5-1µM)
- 40 U/ml Taq DNA-Polymerase
- je 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTP)
- 50 mM KCl*
- 1,5 mM MgCl₂*
- 10 mM Tris-HCl pH 9,0*
- 1-3 µl DNA (als Negativkontrolle: H₂O)

* KCl, MgCl₂ und Tris-HCl sind in dem 10xReaktionspuffer bereits enthalten.

Um ein Verdampfen des Wassers und die durch die Konzentrationsveränderung

C. METHODEN

bedingte Verringerung der PCR-Effizienz zu verhindern, wurde jeder PCR-Ansatz mit ca. 20 µl Mineralöl überschichtet. Nach der Amplifikation wurde das Mineralöl durch Absaugen wieder entfernt.

Für PCR-Reaktionen, die für einen Vergleich der Expression verschiedener Gensegmente konzipiert sind, müssen möglichst identische Bedingungen gewährleistet sein. Deshalb wurden für mehrere Ansätze mit gleichen Primern mit verschiedenen DNA-Proben bzw. für gleiche DNA-Proben mit verschiedenen Primern sog. "Haupt-Puffer" mit allen gemeinsamen Komponenten angesetzt und nach gründlichem Mischen auf die Einzelansätze verteilt.

Die angegebenen Bedingungen konnten für alle PCR-Reaktionen mit einer Variation von 30 - 35 Zyklen angewendet werden.

PCR-Bedingungen:

Denaturierung:		5'	94°C
30 Zyklen à	(Denaturierung)	30''	94°C
	(Primeranlagerung)	30'	56°C
	(Polymerisation)	1'	72°C
End-Polymerisation		5'	71°C

C.2.5.1. TCR-spezifische PCR-Amplifikation

Zur Charakterisierung der T-Zellrezeptoren der allospezifischen T-Zellklone wurde mittels PCR die Expression der variablen Gensegmente (V-Gene) untersucht. Für jede V α - (V α 1-32) bzw. V β - (V β 1-24) Familie stand ein spezifischer 5'-Primer zur Verfügung, der zusammen mit dem in der konstanten Region lokalisierten 3'-Primer (TC α für die TCR α -Kette und 3'C β II für die TCR β -Kette) das von einem Klon exprimierte V-Gensegment als Amplifikat detektieren konnte. Als Kontrolle für das Funktionieren der PCR an sich, sowie als Standard für den Vergleich der Expression verschiedener V-Gensegmente in T-Zelllinien wurde in jedem Ansatz eine Kontrollamplifikation aus dem konstanten Bereich der TCR α - bzw. TCR β -cDNA durchgeführt. Durch die dafür konzipierten Primer (5' α ST und 3' α ST für die TCR α -Kette bzw. 5' β ST und 3' β ST für die TCR β -Kette) wurde ein 351 bp langes Fragment aus der konstanten Region der TCR α -

C. METHODEN

Kette bzw. ein 549 bp-Fragment aus der TCR β -Kette in jedem Ansatz amplifiziert (schematische Darstellung in Abb. C2.4.1.1.).

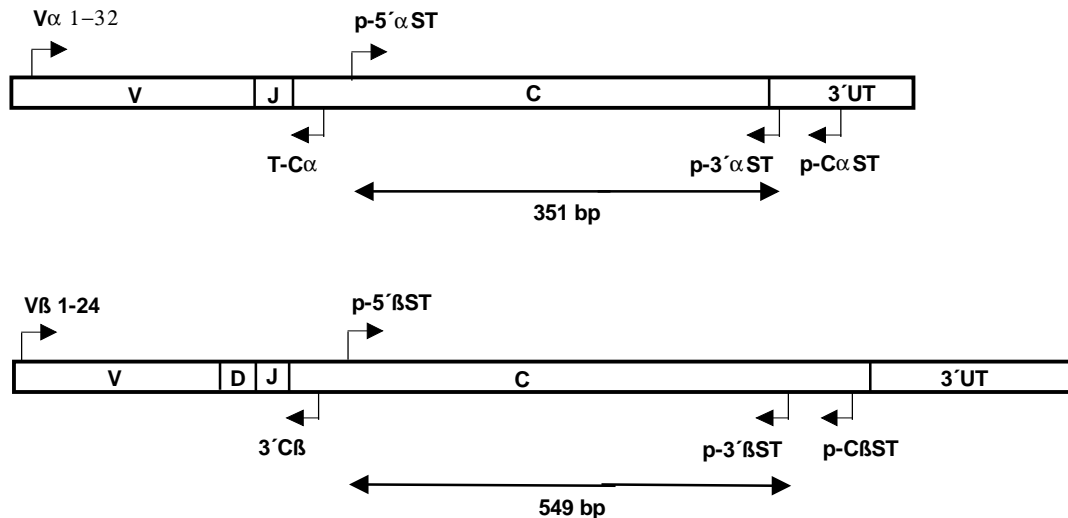


Abbildung C2.5.1.1: Darstellung der TCR-V α - und TCR-V β -cDNA mit den V-, (D-) und J-Gensegmenten, sowie den konstanten Bereichen und den 3' untranslatierten Regionen (3'UT). Die Lokalisationen der Primer für die reverse Transkription (P-C α ST/ P-C β ST), für die Kontrollfragmente (P-5' α ST + P-3' α ST / P-5' β ST + P-3' β ST) und die V-genfamilien-spezifische Amplifikation (V α X + TC α / V β X + 3'C β) sind eingezeichnet.

C.2.6. Sequenzierung der TCR-Amplifikate am A.L.F. mittels

Fluoreszeinmarkierung

Vor der Sequenzierung von PCR-Produkten muß eine vollständige Doppelstrangtrennung erfolgen, um ein Renaturieren der Einzelstränge und die damit verbundene Inhibition der Sequenzreaktion zu vermeiden. Der Strang des biotinylierten Primers 5PX kann durch Bindung an die avidingekoppelten Magnetpartikel vom Komplementärstrang getrennt werden, wodurch beide Stränge sequenzierbar werden.

C.2.6.1. Trennung der DNA-Stränge mittels Magnetpartikeln

Pro Ansatz wurden 30 µl streptavidingekoppelte Magnetpartikel (M-280) einmal mit 40 µl Bindungspuffer gewaschen und dann in 40 µl Bindungspuffer resuspendiert. Durch die Fixierung der Magnetpartikel an der Reaktionsgefäßwand mittels eines Magneten konnten die Waschlösungen vollständig entfernt werden. Zu den Magnetpartikeln wurde dann 40 µl des PCR-Produktes gegeben und der Ansatz 15 min bei RT gerollt. Anschließend wurde der Ansatz einmal mit 40 µl Bindungspuffer und dann mit 40 µl TE gewaschen. Die Magnetpartikel wurden mit 8 µl 0,1M NaOH resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert, wodurch die DNA-Stränge getrennt und die biotinylierten ssDNA-Stränge an der Gefäßwand fixiert wurden. Die NaOH-Lösung mit den unmarkierten DNA-Einzelsträngen wurde in ein Reaktionsgefäß mit 4 µl 0,2M HCl transferiert und dann 1 µl 1M Tris-HCl pH 7,6 zugegeben. Die Magnetpartikel mit den biotinmarkierten DNA-Einzelsträngen wurden einmal mit 40 µl Bindungspuffer und einmal mit 40 µl TE gewaschen und schließlich in 13 µl H₂O resuspendiert (nach Vorgabe des M-280 Herstellers).

Bindungspuffer

- 2 M NaCl
- 10 mM Tris-HCl pH 7,5
- 1 mM EDTA pH 8,0

C.2.6.2. Sequenzierung von DNA-Einzelsträngen mit Fluoreszeinkmarkierung

Zur Sequenzierung wurden 13 µl gelöste Einzelstrang-DNA, 2 µl Sequenzieroligonukleotid und 2 µl Anlagerungspuffer zusammenpipettiert, 5 min bei 65°C inkubiert und schließlich langsam auf RT abgekühlt. Bei 5' fluoreszeinkmarkierten Sequenzieroligonukleotiden wurde anschließend 1 µl Extensionspuffer und 2 µl T7 DNA-Polymerase (1:5 in Enzymverdünnungspuffer verdünnt) zugegeben und je 4,5 µl des Ansatzes zu den je 2,5 µl der vier, auf einer Mikrotiterplatte vorgelegten Terminationsgemischen bei 37°C zugegeben und für 5 min inkubiert. Nach 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopplösung beendet (Auto-Read-Protokoll).

C. METHODEN

Sequenzierungssystem für A.L.F. DNA-Sequenzierautomat (AutoRead-System).

Polymeraselösung

- T7 DNA-Polymerase (8 U/ μ l)
- 25 mM Tris-HCl pH 7,5
- 0,25 M NaCl
- 5 mM DTT
- 50% (v/v) Glycerin

Enzymverdünnungspuffer

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 5 mM DTT
- 100 μ g/ml BSA
- 5% (v/v) Glycerin

Extensionspuffer

- 304 mM Natriumcitrat pH 7,5
- 324 mM DTT
- 40 mM MnCl₂

Stopplösung

- 5 mg/ml Dextranblau
- in deionisiertem Formamid
- DMSO

Terminationslösungen

- 5 μ M ddXTP
- (X = A bzw. C bzw. G bzw. T)
- 1 mM dATP
- 1 mM dCTP
- 1 mM dGTP
- 1 mM dTTP
- 50 mM NaCl
- 40 mM Tris-HCl pH 7,6

C.3. Biochemische Methoden

C.3.1. Herstellung eines Gesamtzelllysats aus EBV-transformierten B-Lymphozyten

Die Isolierung der DR-Moleküle sollte aus einer EBV-transformierten B-Zell-Lymphomzelllinie erfolgen, die homozygot DRB1*0401 und parallel DRB4*01 exprimiert. Diese BM14 genannte Linie wurde zuvor auf eine Zellzahl von 10¹⁰ Zellen expandiert und als Zellpellet bei 80°C gelagert.

Die Zellpellets wurden vereinigt und in 200 ml Lysepuffer aufgenommen und unter 10-minütigem starkem schütteln aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden bei 15.000 x g abzentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Der Zentrifugationsüberstand wurde mit 0,2 ml/min über zwei gekoppelte Säulen geschickt. Bei der ersten Säule handelte es sich um eine Lentil-Lectin-Sepharose-Säule. Sie diente zur unspezifischen Adsorption von Proteinen. Die zweite Säule, mit dem Antikörper L243 gekoppelte CNBr-Sepharose, band spezifisch die MHC-II-DR-Moleküle. Das Gemisch aus DRB1*0401 und DRB4*01 wurde bei pH 11 mittels eines Elutionspuffers von der L243-Säule eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt, deren pH sofort mit Neutralisationspuffer auf einen pH von 8 eingestellt wurde. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde auf einem SDS-PAGE Gel und anschließender Silberfärbung getestet. Geeignete Fraktionen wurden gereinigt und bei 4°C aufbewahrt.

Lysepuffer

- 10 mM Tris / Hcl, pH7,8
- 150 mM NaCl
- 2 mM EDTA
- 1% NP40
- 2 mM PMSF

Waschpuffer

- 10 mM Tris/HCl, pH7,8
- 150 mM NaCl
- 2 mM Dodecylmaltopyranosid

C. METHODEN

Elutionspuffer

- 100 mM NaHCO₃
- 150 mM NaCl
- 2 mM Dodecylmaltopyranosid
- pH 11

Neutralisationspuffer

- 2 M Tris/HCl
- 2 mM Dodecyl-Malto-Pyranosid
- pH 7,8

C.3.2. Unspezifische Proteinbindung an Lentil-Lectin Sepharose

Das aus dem B-Zellymphom BM14 gewonnene Zellysat enthält die gesamten Zellbestandteile. Mit Hilfe einer Lentil-Lectin-Sepharose Säule wurden unspezifisch alle Proteine an die Festphase adsorbiert.

Die Lentil-Lectin-Sepharose wurde in die Säule gefüllt und durch natürliche Gravitation durchlaufen lassen, bis sich ein luftblasenfreies Sediment abgesetzt hatte. Anschließend wurde mit 2-fachem Volumen Lysepuffer (siehe Kap. 3.1) gewaschen. Die Säule konnte nun mit dem Zellysat beladen werden.

C.3.3. Isolierung von DR-Molekülen über CNBr-aktivierte Sepharose

1g trockene CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde in 1 mM HCl für 15 min inkubiert und anschließend mit 200 ml 1 mM HCl in einer Fritte gewaschen. 6 mg Antikörper (L243) wurden in 10 ml Kopplungspuffer vorgelöst. Das Gel wurde in 5 ml Kopplungspuffer aufgeschlämmt, abgesaugt und schnell mit der Antikörperlösung vereinigt. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur mit 100 rpm geschüttelt. Danach wurden die restlichen CNBr-Gruppen mit 0,2 M Glyzin in Kopplungspuffer geblockt. Dann wurde abwechselnd mit Kopplungspuffer, pH 8,6 und Acetatpuffer, pH3,0 gewaschen. Das Gel wurde in PBS mit je 0,02% Azid und Thimerosal aufbewahrt.

Kopplungspuffer

- 0,1 M NaHCO₃
- 0,5 M NaCl
- pH 8,6

Acetatpuffer

- 100 mM NaAcetat
- 150 mM NaCl
- pH 3,0

C.3.4. Trennung von DR-Molekülen über Protein G-Sepharose

Für die Trennung des HLA-DR-Gemischs der DRB1*0401- und DRB4*01-Allele wurde im Anschluß an die L243-gekoppelte CNBr-Sepharose-Säule eine Immunpräzipitation der DRB1*0401-Moleküle an einen DR4-spezifischen Antikörper (2aB8) durchgeführt, der an Protein G-Sepharose gekoppelt war.

Der 2aB8-haltige Hybridomüberstand wurde mit 1 g Protein-G-Sepharose vermischt und für 90 min inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 x g wurde mit Boratpuffer gewaschen und die antikörpergekoppelten Beads anschließend in Boratpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 mM Dimethylpimelidate wurde 30 min inkubiert. Nach dem Waschen mit 0,2 M Ethanolamin wurden die Beads in PBS/0,01% Azid aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Trennung des DR-Gemischs wurden die Beads in eine Säule gegeben. Vor dem Auftragen des DR-Eluats aus der L243-gekoppelten CNBr-Sepharose wurde die unspezifische Bindung mit 0,1 M Glyzin abgeblockt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das DR-Eluat über die Säule geschickt. Die DRB1*0401-Moleküle wurden somit an die Säule gebunden und die DRB4*01-Moleküle im Eluat angereichert.

C.3.5. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde entsprechend der Vorschrift nach Laemmli (Laemmli et al, 1970) durchgeführt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und nach 5 min Kochen in die Probentasche aufgetragen.

Die Proteinproben werden über ein 10%iges Polyacrylamidgel (Acrylamid-Bisacrylamid) bei konstanter Stromstärke von 15 mA in ca 90 min aufgetrennt.

Probenpuffer

- 50 mM Tris/HCl
- 10% Glycerol
- 2% SDS

- 0,02% Bromphenolblau
- 100 mM DTT
- pH 6,8

C.3.6. Silberfärbung

Zur Sichtbarmachung der Proteine wurden die SDS-Gele einer Silberfärbung unterzogen. Hierfür wurden sie zunächst 1 h mit Fixierlösung behandelt und 3 x 20 min mit

C. METHODEN

30% Ethanol gewaschen. Nach 1 min Inkubation mit 0,02% Natriumthiosulfatlösung wurde 3 x 20 sek mit H₂Odest gewaschen und das Gel mit 0,2% Silbernitrat, 0,02% Formaldehydlösung 20 min gefärbt. Erneutem Waschen mit H₂Odest (2 x 20 sek) folgte die Entwicklung gefärbter Proteinbanden innerhalb von 5 min mittels Entwicklerlösung.

Fixierlösung

- 40% Methanol
- 10% Eisessig

Entwicklerlösung

- 6% Natriumcarbonat
- 0,05% Formaldehyd
- 0,0004% Natriumthiosulfat

Silbernitratlösung

- 0,2% Silbernitrat
- 0,02% Formaldehyd

C.3.7. Western Blot zum Nachweis der DR-Moleküle mit Hilfe von Antikörpern und Chemifluoreszenz

Nach Isolierung aus dem Gesamtzellsat aus den B-Lymphozyten durch Immunpräzipitation an antikörpergekoppelte Säulen, wurden die DR-Moleküle im Western Blot nachgewiesen.

Je 4 µl bzw. 8 µl der DR-Eluate wurden in einem 10% SDS-PAGE (Laemmli et al, 1970) aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden zwei Gesamtzellsate aus EBV-transformierten B-Zellymphomen mit aufgetragen. Hierfür wurden 1 x 10⁶ Zellen in 50 µl Probenpuffer, der mit β-Merkaptoethanol supplementiert war, lysiert. Um die Lyse zu unterstützen, wurde die Suspension 15 s stark geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und je 15 µl auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Immobilon P Membran transferiert. Zur Detektion der DRB1*0401 und DRB4*01 Moleküle wurde die ECF-Methode laut Anweisung der Hersteller durchgeführt. Für den Nachweis der beiden DR-Allele wurde die Membran für 1h mit dem mAk DR53+(DRB4*01), bzw. dem 2aB8 (DRB1*0401) bei RT hybridisiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit einem, mit alkalischer Phosphatase markierten anti-Maus Antikörper. Nach Zugabe des ECF-Substrats wurde die Fluoreszenz im Fluorimager detektiert.

C.3.8. HLA-DR-Peptid Bindungstest

Zur Untersuchung der Peptid-MHC Interaktion diente ein Peptidbindungstest, der als Trennprinzip von Rezeptor und Ligand die Immunpräzipitation ausnutzte und neugebildete Komplexe direkt gebunden an der Festphase detektierte. Die Bestimmung der relativen Kapazitäten von Peptiden erfolgte in einem Kompetitionsansatz, indem der biotinylierte Agonist mit variablen Konzentrationen des zu messenden Antagonisten koinkubiert wurde. Dazu wurden 15 pmol affinitätschromatographisch gereinigte HLA-DR Moleküle bei 37°C für 48 h mit 200 pmol biotinylierten und einem 50-200-fachen Überschuß an unmarkiertem Peptid (10-40 nmol) in Bindungspuffer inkubiert. Nach 48 h wurde der neutralisierte Bindungsansatz von unbehandelten 96-well Mikrotiterplatten auf Platten transferiert, die mit mAk DR53+ (über Nacht, 4°C, 10 µg/ml in 50 mM Na-Carbonat, pH 9,3) beschichtet waren. Nach Immunpräzipitation (2 h, RT) wurde der MHC-Peptid Komplex durch Inkubation mit Europium-markiertem Steptavidin (3 h, 37°C) und anschließender Inkubation mit einer Verstärkerlösung (1 ½ h, RT) detektiert. Die Lichtquantenemission wurde photometrisch im Multilabel Counter bei 590 nm gemessen. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Mikrotiterplatten 4 x mit Waschpuffer gewaschen. Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Waschpuffer auf die entsprechende Verdünnung eingestellt.

Bindungspuffer

- 2 mM EDTA
- 25 nM Na-Carbonat
- 50 mM Tris/HCl
- 0,5% Octylglycosid
- 0,01% Azid
- 0,1 mM PMSF
- 0,1% NP-40
- pH 5

D. Ergebnisse

D.1. Etablierung GAD-spezifischer T-Zellen

Glutaminsäure-Decarboxylase-(GAD)-spezifische T-Zellen können in erster Linie im peripheren Blut von Prädiabetikern und neu-diagnostizierten Diabetespatienten detektiert werden. Die Etablierung solcher T-Zelllinien (TCL) und -klone (TCC) erfolgte im Labor von Dr. Josef Endl bei der Firma Boehringer Mannheim in Penzberg, die anschließenden zellulären und molekularbiologischen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dolores Schendel am Institut für Immunologie der LMU-München.

Die peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden aus heparinsiertem Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficollgradienten isoliert. Nach Stimulation mit humaner GAD wurden Mikrokulturen angelegt. Diese wurden unter geeigneten Medienbedingungen und durch IL-2-Zugabe expandiert. Um T-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur halten zu können, müssen sie in regelmäßigen Abständen erneut mit Antigen konfrontiert werden. Diese Restimulation erfolgte durch antigen-präsentierende Zellen (APC), die Epitope der GAD HLA-restringiert auf der Zelloberfläche trugen. Hierfür wurden zunächst PBL desselben Patienten verwendet, da somit eine vollständige Übereinstimmung der HLA-Allele gewährleistet war. Nach Inkubation mit der nativen GAD wurden die PBL bestrahlt, um ihre eigene Proliferation zu unterbinden. Da für die weiteren Restimulationen größere Mengen an APC benötigt wurden, griff man auf PBL von Kontrollspendern zurück, die in ihrer HLA-Expression, im besonderen der MHC-Klasse-II-Expression, mit der des Diabetes Patienten weitgehend übereinstimmten. Tabelle D.1.a zeigt die Expression der DR- und DQ-Allele dreier Diabetespatienten und der Kontrollspender.

Für die Restimulation wurde jede Mikrokultur geteilt, wobei eine weiterhin mit, die zweite ohne Antigen stimuliert wurde. Durch visuellen Vergleich der beiden Tochterkulturen im Binokular wurden die Kulturen als spezifisch deklariert, die nur nach Stimulation mit dem Antigen proliferierten. Diese

D. Ergebnisse

sogenannte Split-Well Technik erlaubte es mehrere unabhängige T-Zelllinien zu isolieren.

Die GAD-Spezifität wurde anschließend im Proliferationstest durch Tritium-Thymidin-Einbau getestet. Eine T-Zelllinie wurde dann als spezifisch deklariert, wenn das Verhältnis der Proliferationsrate mit antigenstimulierten, zu ohne antigenstimulierten Kulturen größer 3 ergab.

Patient	HLA-Klasse-II-Allele		
	DRB1*	DQA1*	DQB1*
6	0301/0401	0501/0301	0201/0302
40	0401/0401	0301/0301	0302/0302
24	1501/1601	0102/0102	0602/0502
Kontrollspender			
Kp3	0401/0301	0301/0501	0302/0201
Kp35	1501/0301	0102/0501	0602/0201
Kp41	1601/0101	0102/0101	0502/0501

Tabelle D.1.a: HLA-Klasse-II-Typisierung der drei Diabetespatienten, aus denen GAD-spezifische T-Zellklone im Labor von Dr.Endl etabliert worden waren und der Kontrollspender, deren periphere Blutlymphozyten als Stimulatorzellen für die T-Zellen eingesetzt wurden.

Aus einer spezifischen Linie wurden anschließend durch limitierende Verdünnung Klone etabliert. Die Bezeichnung eines solchen Klones setzt sich zusammen aus der Patientennummer, der Linie, aus welcher er etabliert wurde und der Nummer des jeweiligen Klonierungsansatzes. Die Titulierung

40/2#38 bedeutet also der 38. Klonierungsansatz, der Linie 2 des Patienten 40.

D.1.2. GAD-spezifische T-Helfer-Zellen

Die Frage, ob es sich bei den hier etablierten T-Zellen um CD8-positive zytotoxische T-Zellen handelt oder um CD4-positive T-Helfer-Zellen, wurde mittels durchflußzytometrischer Analysen beantwortet. Dabei wurde die Expression der CD4- und CD8-Kostimulatoren mittels monoklonaler Antikörper (mAk) ermittelt.

Die Messung im FACScan zeigte, daß alle T-Zellklone den FITC-markierten CD4-mAk gebunden hatten, nicht aber den PE-markierten CD8-mAk. Abbildung D.1.2.a zeigt dieses Bindungsverhalten am Beispiel des TCC 40/2#38. Bei den hier etablierten T-Zelllinien und -klonen handelte es sich somit um CD4-positive T-Helfer-Zellen. Diese Zellen erkennen normalerweise ein Antigen das von Molekülen des HLA-Klasse-II-Komplexes präsentiert wird. Um diese Restriktion zu bestätigen waren noch weitere Experimente notwendig, z.B. die Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, die in der HLA-Expression mit der des Patienten zwar weitgehend übereinstimmten, sich in einzelnen HLA-Allelen jedoch unterschieden. Sind solche APCs nicht in der Lage die T-Zellen zu stimulieren, so kann die Erkennung dem ungleichen Allel zugeordnet werden. Eine andere Möglichkeit ist die Inhibition der Stimulation mit verschiedenen, gegen HLA gerichteten monoklonalen Antikörpern. Beide Methoden werden in dieser Arbeit an anderer Stelle beschrieben.

D. Ergebnisse

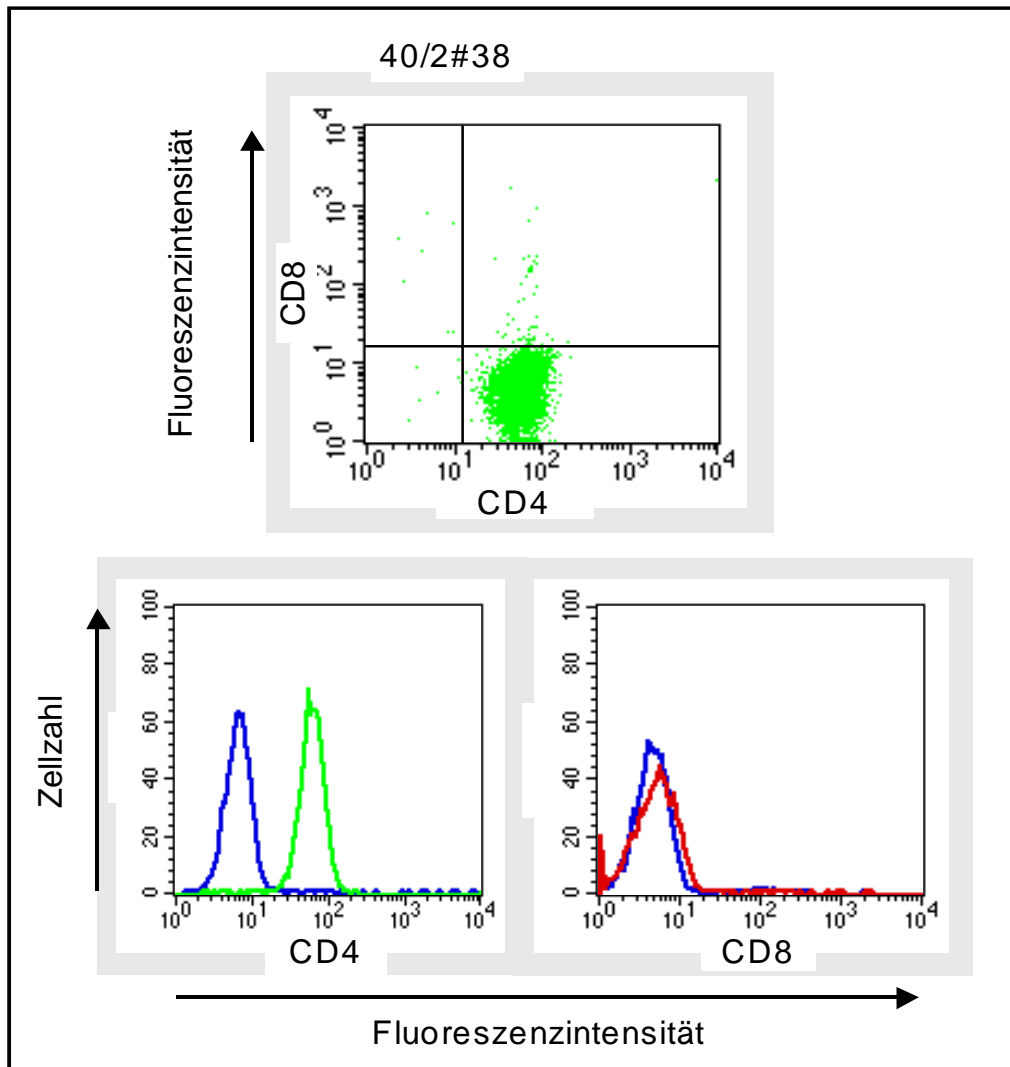


Abbildung D.1.2.a: Phänotypische Charakterisierung der GAD-spezifischen T-Zellklone des Patienten 40 hier am Beispiel des Klons 40/2#38 dargestellt. Die Doppelmarkierung mit den Antikörperkombinationen CD4(FITC)/CD8(PE) erlaubte die Definition der Klone als CD4-positive T-Zellen. Als Isotypkontrolle diente der T-zellunspezifische mAk UPC10.

Eine erste Schwierigkeit stellte die Definition der GAD-Spezifität dar. Die im Proliferationstest als positiv deklarierte Linie, könnte auch spezifisch gegen eine Verunreinigung des GAD-Präparats reagieren. Die Inkubation der APC mit einzelnen GAD-Peptiden anstelle des nativen Proteins ist neben der Sicherstellung der Spezifität auch ein geeigneter Weg zur Bestimmung des erkannten antigenen Epitops.

D.2. Bestimmung des antigenen Epitops

D. Ergebnisse

Um die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) und dem von ihm erkannten HLA-Peptid Komplex zu verstehen, mußte zunächst die Aminosäuresequenz der GAD definiert werden, die vom HLA-Molekül präsentiert und vom TCR erkannt wird.

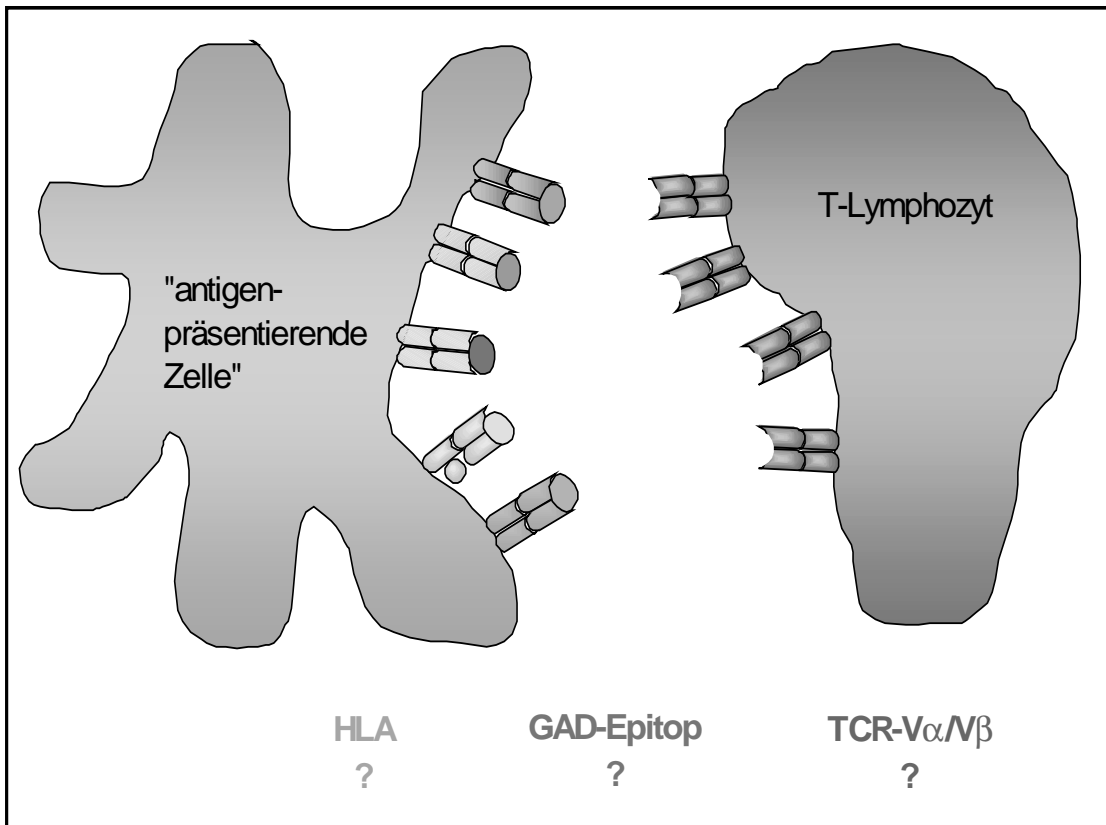


Abbildung: Darstellung der HLA-Antigen-TCR-Interaktion.

D.2.1. Bestimmung der erkannten GAD-Peptid Sequenz

Für die Analysen zur Eingrenzung des antigenen GAD-Epitops wurden Peptide verwendet, die in ihrer Gesamtheit die Aminosäuresequenz der humanen GAD abdeckten. Die 20 Aminosäure-(AS)-langen Peptide überlappten in ihrer Sequenz um jeweils 10 AS mit ihrem Nachbarpeptid, so daß die Lage eines potentiellen Epitops im mittleren Bereich eines

Peptids gewährleistet war. Diese Peptide wurden dann anstelle der GAD mit den PBL inkubiert und somit zur Stimulation der T-Zelllinien (TCL) und -klone (TCC) eingesetzt.

Dieses Experiment lieferte neben der Information des erkannten GAD-Epitops den zusätzlichen Beweis, daß die etablierte Linie, bzw. der Klon tatsächlich spezifisch gegen GAD gerichtet war. Ein Problem dieses Projekts war es, die T-Zellen zu etablieren, die gegen GAD, nicht aber gegen verunreinigende Produkte des GAD-Präparats gerichtet waren. Diese, im Proliferationstest zunächst als falsch-positiv gewerteten Linien konnten erst nach Stimulation mit den Peptiden als GAD-unspezifisch entlarvt werden.

D.2.1.1. Stimulation GAD-spezifischer T-Zellen mit Peptidpools

Da die GAD-spezifischen T-Zellen schwierig zu etablieren und zu vermehren waren, mußten die Experimente immer so gewählt werden, daß möglichst wenig Zellen benötigt wurden. Deshalb wurden die 57 20mer Peptide zunächst in Pools von jeweils vier bis sechs Einzelpeptiden zusammengefaßt. Die Reaktivität von TCL des Patienten 40 gegen PBL des Kontrollspenders Kp3, die zuvor mit den 15 Peptidpools inkubiert worden waren, wurde im Proliferationstest getestet. Es war zu erwarten, daß nur die PBL in der Lage waren die T-Zellen zu stimulieren, welche das GAD-Peptid auf ihrer Oberfläche präsentierten, das auch nach Prozessierung der nativen GAD auf den PBL vorlag.

Die Graphik I der Abbildung D.2.1.1.a zeigt die Tritium-Thymidin-Einbaurate (cpm) nach Stimulation der T-Zellen mit GAD-präsentierenden PBL, im Vergleich zu Kontroll-PBL ohne GAD. Das Verhältnis von 13000 cpm mit GAD, zu 1000 cpm ohne GAD, ergab einen Stimulationsindex (SI) von 13. Dies deutet auf eine Spezifität dieser Linie gegen GAD hin.

D. Ergebnisse

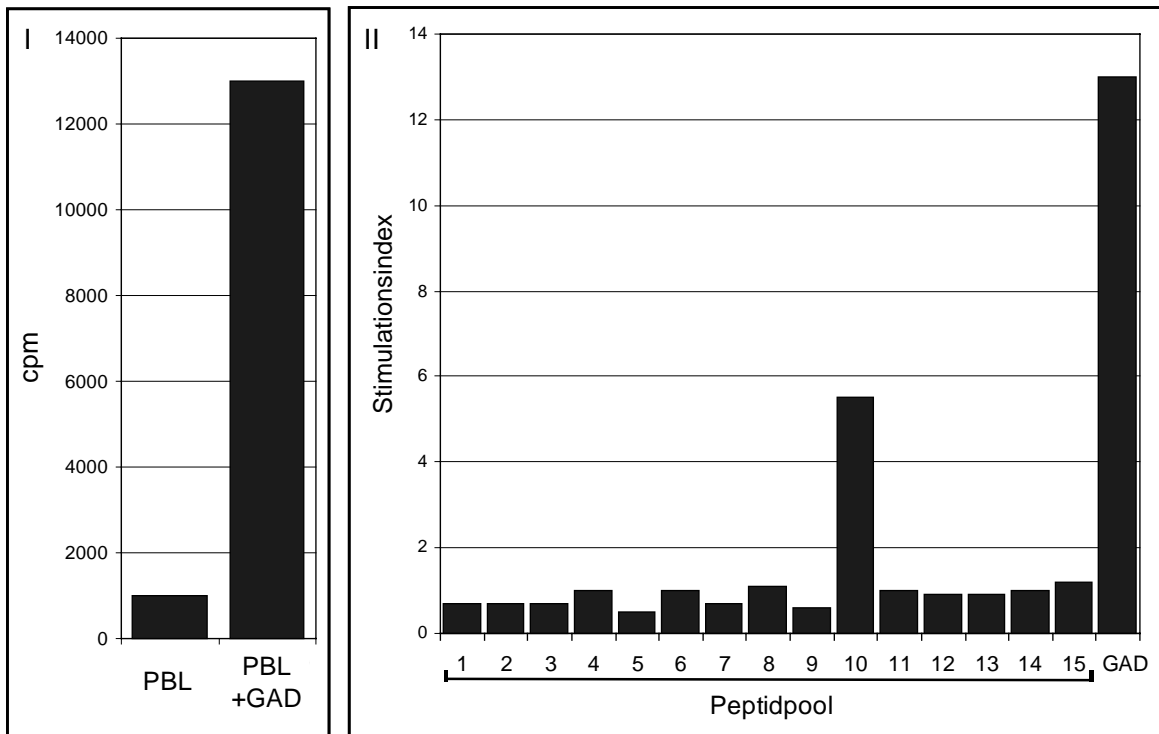


Abbildung D.2.1.1.a: Proliferationstest der T-Zelllinie 40/2 nach Stimulation mit PBL des Kp3. I: Stimulationsindex nach Zugabe von PBL mit, bzw. ohne Antigen. II: Stimulationspotential der einzelnen Peptidpools, mit den die PBL des Kp3 inkubiert wurden.

Die graphische Darstellung II (Abb. D.2.1.1.a) der Stimulation durch die einzelnen Peptidpools zeigte deutlich einen erhöhten Thymidineinbau bei den durch Pool 10 stimulierten Zellen. Geringfügige Proliferation ist auch nach Stimulation mit den 14 weiteren Pools zu sehen, diese übersteigt jedoch nicht die des Hintergrunds, d.h. mit PBL, die weder mit Peptiden noch mit nativer GAD inkubiert worden waren.

D. 2.1.2. Stimulation durch die Einzelpeptide des Pools 10

Im nächsten Schritt war nun die Frage zu klären, welches der vier Einzelpeptide des Pools 10 für die Stimulation der T-Zellen verantwortlich war. PBL des Kp3 wurden mit den Peptiden p26-45, p436-455, p496-515 und p556-575 inkubiert. Die einzelnen Ziffern geben die Stelle an, die die Aminosäure in der Gesamtsequenz der 585 AS-langen GAD einnimmt. So deckt z.B. das Peptid p26-45 die AS-Sequenz 26 bis 45 im aminoterminalen Bereich der GAD ab.

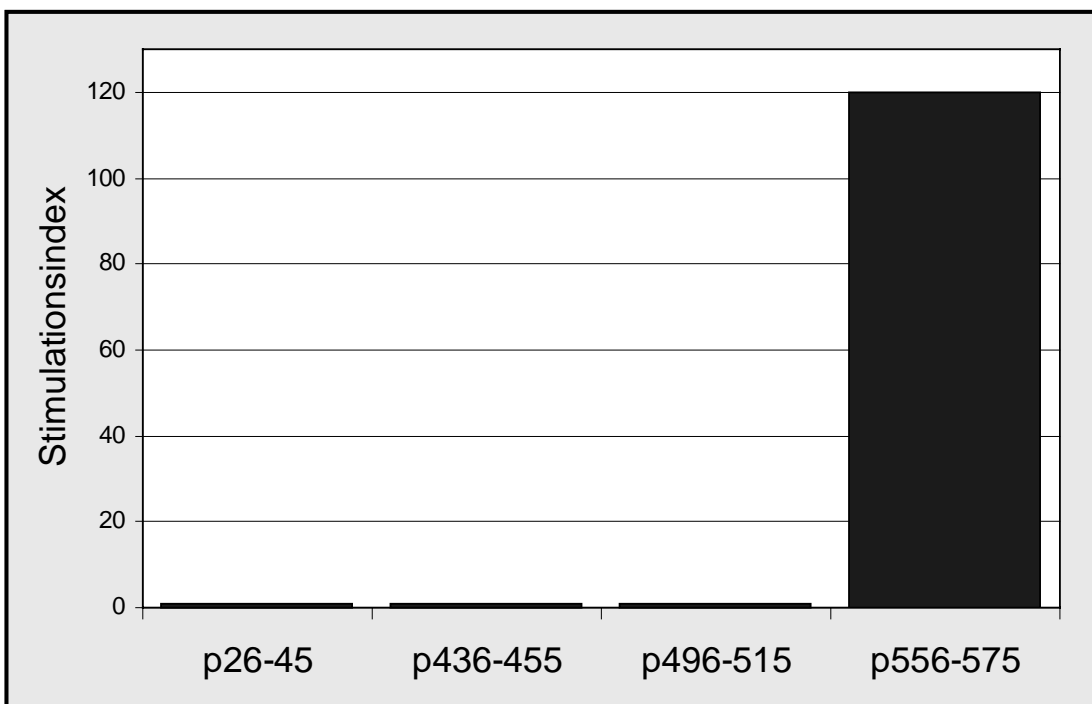


Abbildung D.2.1.2.a: Proliferationstest der Linie 40/2 nach Stimulation mit den, in Pool 10 enthaltenen Einzelpeptiden. Der Stimulationsindex ergab sich aus dem Quotienten der eingebauten cpm mit Peptid zu eingebauten cpm ohne Peptid.

In Abbildung D.2.1.2.a ist zu sehen, daß die TCL ausschließlich durch die Erkennung des Peptids, welches das GAD-Epitop p556-575 trägt, stimuliert wurde. Keines der drei weiteren Peptide in diesem Proliferationstest konnte von dieser Linie erkannt werden.

Neben der Bestimmung des Epitops verifizierte die Stimulierbarkeit

D. Ergebnisse

durch einzelne Peptide die GAD-Spezifität dieser Linie. Aus dieser somit eindeutig als spezifisch deklarierten Linie wurden anschließend mehrere unabhängige Klone etabliert, die in den weiteren Experimenten eingesetzt wurden.

Die Länge der hier eingesetzten Peptide wurde zunächst auf zwanzig Aminosäuren festgelegt. HLA-Klasse-II-Moleküle binden jedoch üblicherweise Peptide mit einer Länge von 12-14 Aminosäuren in ihrer Bindungstasche, um sie den Rezeptoren der T-Zellen zu präsentieren. Es ist daher zu erwarten, daß nicht die gesamte Sequenz des Peptids p556-575 für die Bindung an das HLA-Molekül und die Erkennung durch den TCR notwendig ist und auch nicht dem natürlichen GAD-Epitop entspricht. In einem weiteren Proliferationstest wurde die minimale Sequenz definiert, welche für die T-Zell-Aktivierung notwendig ist.

D.2.1.3. Definition des Minimalepitops

Ausgehend von der Sequenz des Peptids p556-575 wurden von Prof. Jung aus Tübingen Peptide synthetisiert, die im N- und im C-terminalen Bereich deletiert waren. Diese verkürzten Peptide wurden dann, wie bereits in den vorhergehenden Experimenten, mit den PBL des Kp3 inkubiert, damit sie MHC-restringiert auf deren Oberfläche präsentiert werden konnten. Nur die Peptide, die noch das vollständige GAD-Epitop trugen, sollten in der Lage sein, die T-Zellen zu stimulieren. In einem Proliferationstest wurden diese peptidpräsentierenden PBL zu vier verschiedenen TCC des Patienten 40 gegeben, um deren Stimulierbarkeit durch die verkürzten Peptide zu testen (Abb. D.2.1.3.a).

D. Ergebnisse

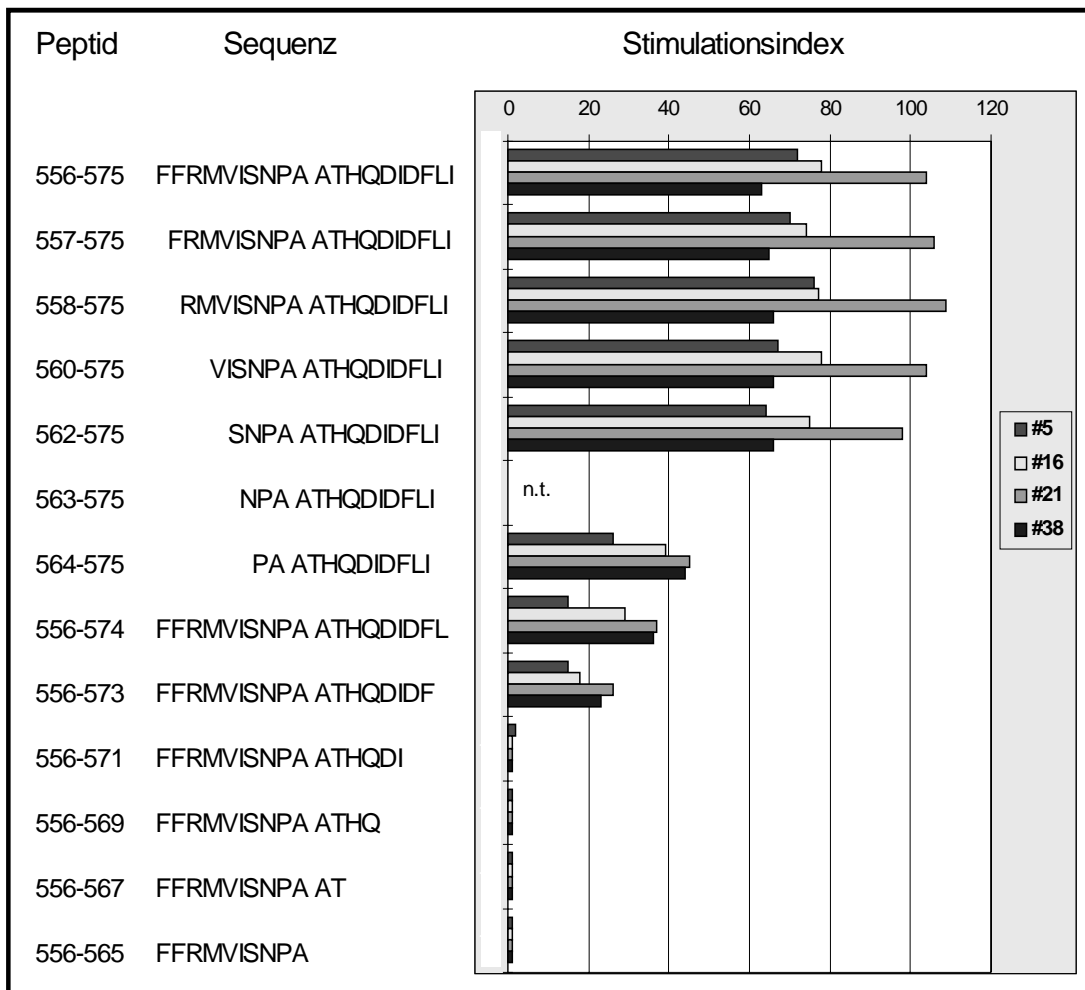


Abbildung D.2.1.3.a: Proliferationstest zur Definition des von den GAD-spezifischen T-Zellklonen des Patienten 40 erkannten Minimalepitops. Die vier TCC 40/2#5, #16, #21 und #38 wurden mit PBL des Kp3 stimuliert, die zuvor mit Peptiden inkubiert worden waren, die ausgehend vom 20mer p556-575 Verkürzungen im N- und im C-terminalen Bereich aufwiesen.

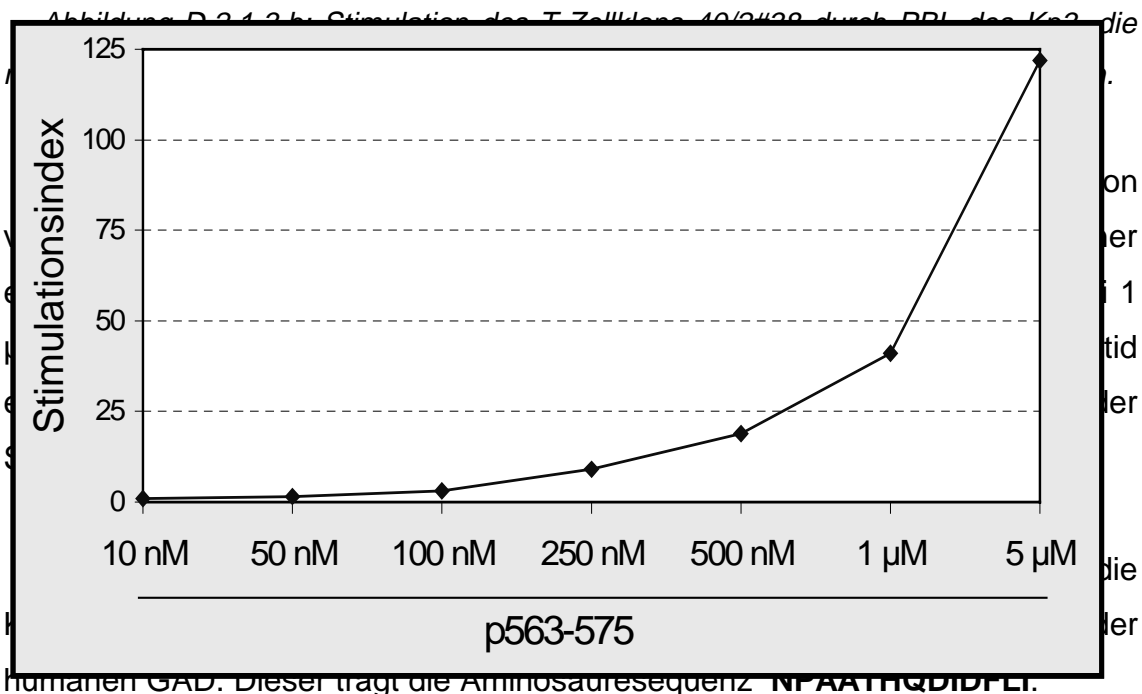
Alle vier TCC, die aus der Linie 2 des Patienten 40 rekloniert wurden, zeigten starke Proliferation mit dem 20mer p556-575. Die Verkürzung im aminoterminalen Bereich wird toleriert, solange Serin S (562) und Asparagin N (563) erhalten bleiben. Die Deletion dieser beiden Aminosäuren führte zu einem Stimulationsverlust von mehr als 50%. In weiteren Experimenten, deren Daten hier nicht graphisch dargestellt sind, zeigte sich, daß dieser Verlust erst durch die Deletion des Asparagins N (563) verursacht wurde.

D. Ergebnisse

Noch drastischere Auswirkungen zeigten die Verkürzungen in der carboxyterminalen Region des Peptids. Nach Deletion der beiden endständigen Aminosäuren Leucin L (574) und Isoleucin I (575) sank die Stimulationsrate um mehr als die Hälfte. Wurde das Peptid auch noch um die zwei weiteren Aminosäuren, die Asparaginsäure D (572) und das Phenylalanin F (573) gekürzt, führte dies zum vollständigen Abbruch der T-Zellstimulation.

Dieses Stimulationsmuster war für alle vier, in Abbildung D.2.1.3.a aufgeführten TCC gleich. Das minimale Peptid, welches noch in der Lage war alle aus Patient 40 etablierten GAD-spezifischen T-Zellklone zu stimulieren trug die Sequenz p563-575.

Um die Sensitivität der T-Zellen gegen das minimale GAD-Epitop zu evaluieren, wurde in einem Proliferationstest, die eingesetzte Peptidmenge titriert. Die Titration des p563-575-Peptids, mit welchen die PBL des Kp3 inkubiert wurden lagen zwischen einer Konzentration von 10 nM bis 5 μ M. Die folgende Graphik (Abb. D.2.1.3.b) zeigt das Stimulationsverhalten des Klons 40/2#38.

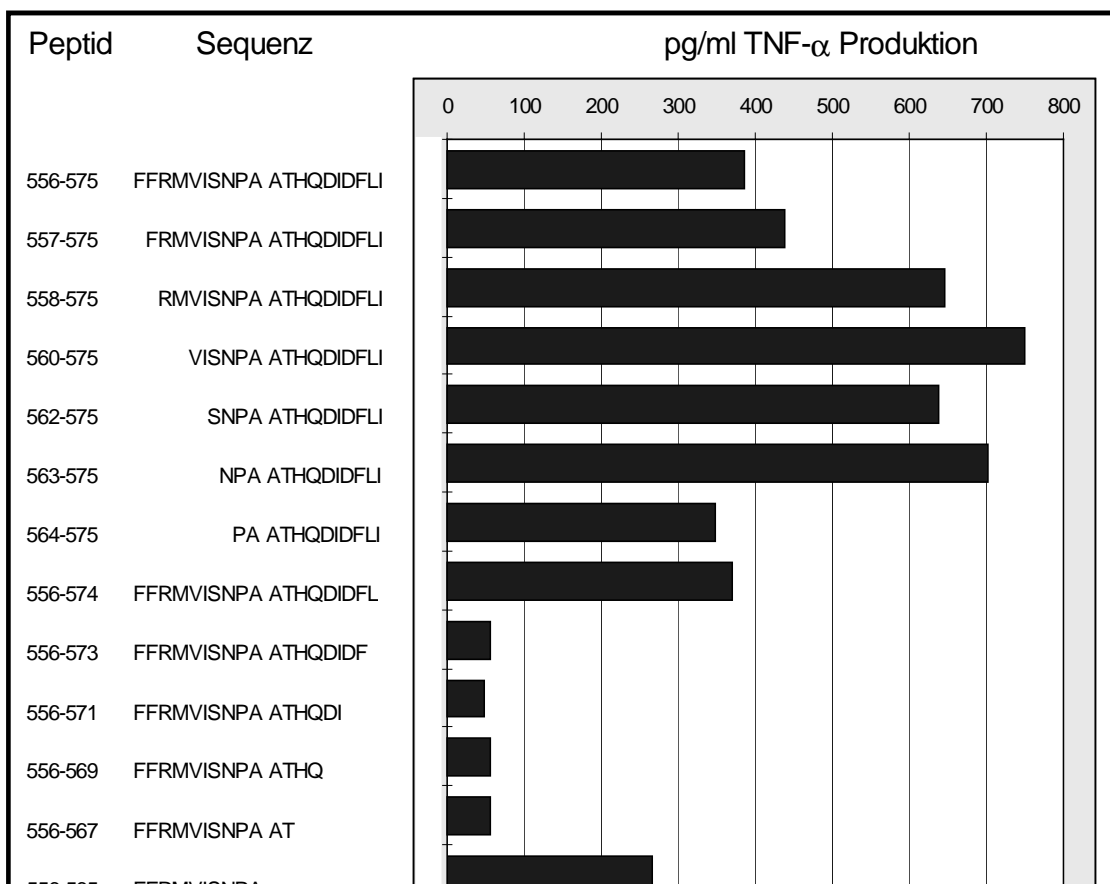


D. Ergebnisse

D.2.2. TNF- α Sekretion

Eine weitere Möglichkeit, die Stimulation von T-Zellen zu testen, ist die Detektion der von ihnen ausgeschütteten Zytokinen. Eine gängige Methode die Stimulation vor allem von T-Zellen zu messen, die nicht mit Proliferation auf einen Stimulus reagieren, ist die Detektion des Tumor-Nekrose-Faktors-alpha (TNF- α) im Zellkulturüberstand. Da TNF- α auch bei den komplexen Vorgängen der Zerstörung der insulin-produzierenden β -Zellen bei Diabetes involviert zu sein scheint, lag es nahe, dessen Produktion durch die GAD-spezifischen T-Zellen zu überprüfen.

Der TCC 40/2#38 wurde parallel zu einem analogen Proliferationstest mit PBL des Kp3 stimuliert, die zuvor mit den einzelnen verkürzten Peptiden des p556-575 inkubiert worden waren. 24 Stunden nach Restimulation wurde ein Teil des Kulturüberstandes abgenommen und der TNF- α Gehalt in einem zellulären Bioassay bestimmt. Das Testsystem beruhte auf der Detektion der Überlebensrate TNF-sensitiver, sog. Wehi-Zellen durch einen vitalen Farbstoff.



D. Ergebnisse

Abbildung D.2.2.a: Darstellung der von den TCC des Patienten 40 produzierten TNF- α Menge nach Stimulation mit PBL des Kp3 in Kombination mit verkürzten Peptiden (untersuchter Klon: 40/2#38).

Die in Abbildung D.2.2.a dargestellte TNF- α Produktion des TCC 40/2#38 lag bei maximal 750 pg/ml. Das TNF- α -Muster nach Stimulation mit den in Kapitel D.2.1.3. beschriebenen verkürzten Peptiden ist weitgehend analog zu dem Proliferationsmuster, welches in Abbildung D.2.1.3.a zu sehen war. Die Produktion schien hier jedoch nach Stimulation mit mehreren verkürzten Peptiden noch höher zu sein als mit dem längeren Ausgangspeptid. Mögliche Erklärungen dieses Phänomens werden erst durch Erkenntnisse der HLA-Restriktion klar und werden im Diskussionsteil noch ausführlich behandelt. Ausserdem muß berücksichtigt werden, daß dieser Bioassay anfälliger und ungenauer ist als ein Proliferationstest mit Tritium-Thymidin, da hier mehrere Variablen Einfluß nehmen. Die aus der T-Zellstimulation gewonnenen Kulturüberstände wurden auf die Wehi-Zellen übertragen. Die Messung des TNF- α -Gehalts erfolgte jedoch erst nach drei Tagen und nach mehreren Pipettierschritten, so daß Ungenauigkeiten bei jedem Schritt potentiell werden könnten.

D.2.3. Stimulationspotential der Epitope von TCC anderer Patienten

In Proliferationstests, die im Labor von Dr. Endl durchgeführt wurden zeigte sich, daß GAD-spezifische T-Zellen eines weiteren Patienten (Pat. 6) durch das Peptid p226-283 stimuliert wurden. Da Patient 40 und 6 beide HLA-DRB1*0401 exprimieren, welches mit einem erhöhten Diabetesrisiko assoziiert ist, war es von Interesse, die Stimulierbarkeit der TCC des Patienten 40 durch das Peptid p266-283 zu überprüfen.

In einem Proliferationstest wurde der Klon 40/2#38 mit PBL des Kp3

D. Ergebnisse

stimuliert, die zuvor mit jeweils p563-575, p266-283 bzw. mit beiden Peptiden gleichzeitig und im gleichen Mengenverhältnis inkubiert worden waren.

In der Graphik D.2.3.a ist zu sehen, daß dieser Klon des Patienten 40 nicht durch das weitere Epitop des Patienten 6, dem Peptid p266-283, stimuliert werden konnte. Dieses Peptid ist auch nicht in der Lage, die Stimulation der T-Zellen durch das Peptid p563-575 signifikant zu inhibieren, was bei einer kompetitiven Inhibition um eine Bindungsstelle zum Ausdruck kommen würde.

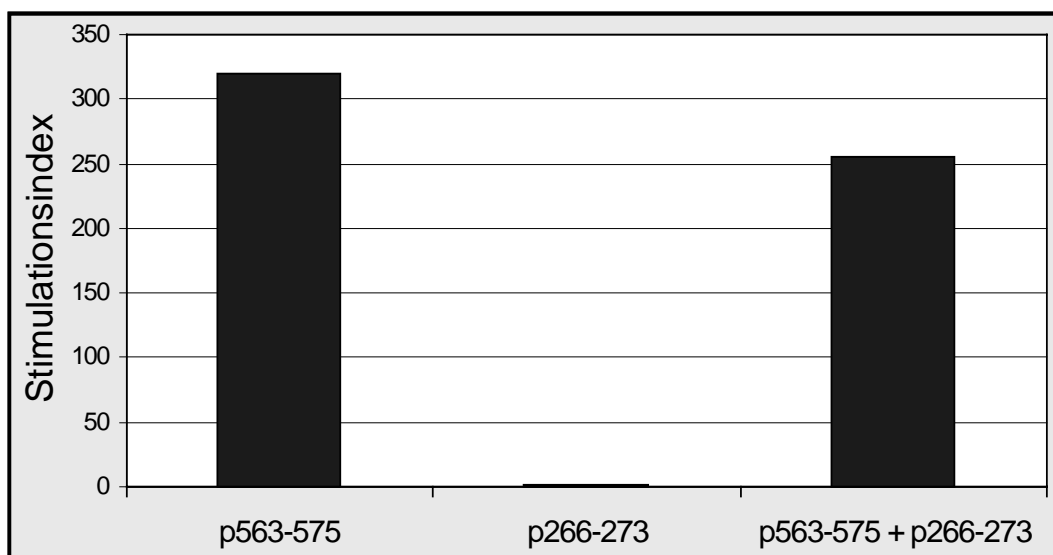
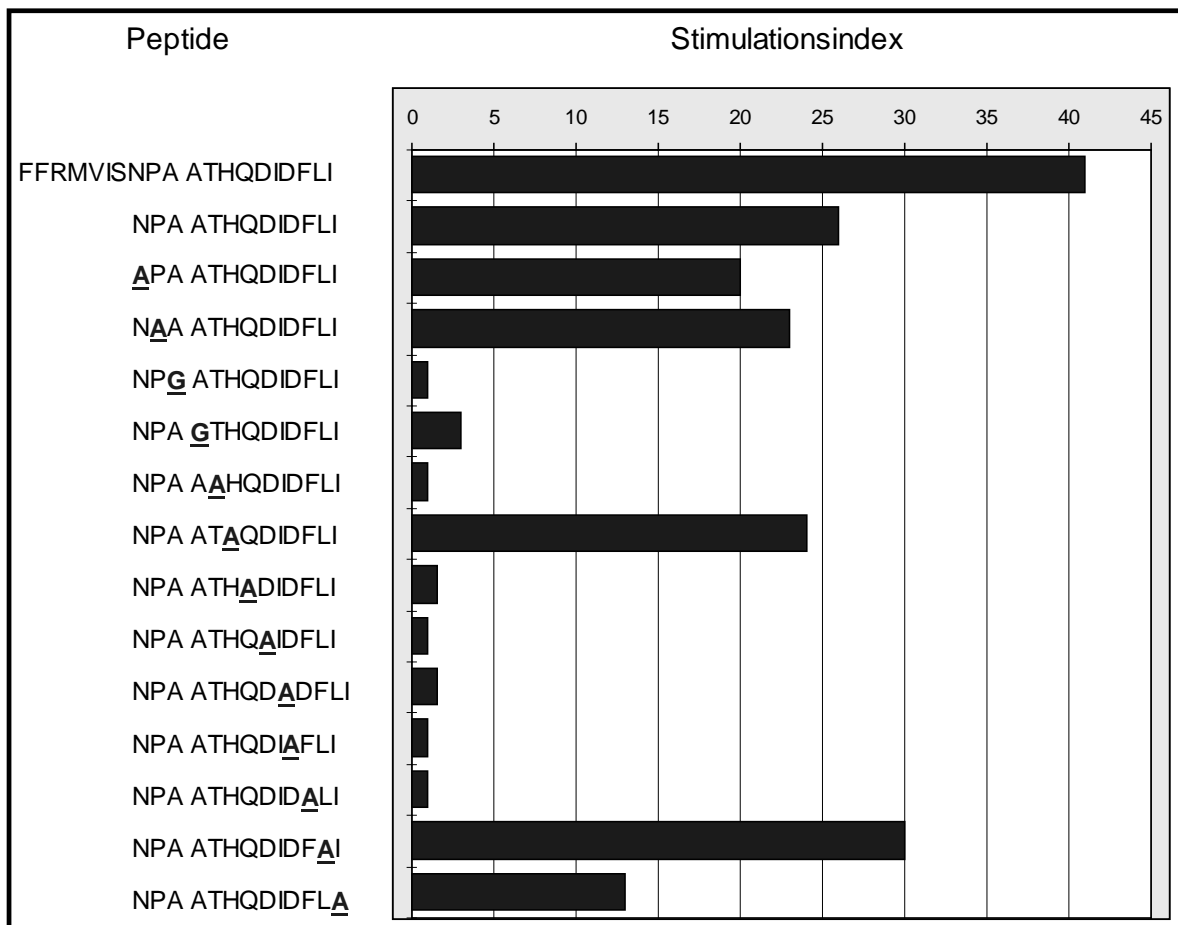


Abbildung D.2.3.a: Stimulation des TCC 40/2#38 mit PBL des Kp3, die zuvor mit dem Minimalpeptid p563-575 inkubiert worden waren, bzw. mit dem GAD-Peptid p266-273, das von den T-Zelllinien des Patienten 6 erkannt wird.

Daß die T-Zellen des Patienten 40 nicht, durch das von den T-Zellen des Patienten 6 erkannten Epitops, stimuliert werden und umgekehrt, könnte zum einen an der Expression unterschiedlicher T-Zellrezeptoren (TCR) liegen oder an der Präsentation des jeweiligen Peptids durch verschiedene HLA-Moleküle. Diese Fragen werden in den Kapiteln D.3. und D.4. geklärt werden.

D.2.4. Identifizierung der HLA-Anker und der T-Zellrezeptor-Kontaktpositionen

Für die Bindung eines Peptids an ein HLA-Molekül, bzw. für die Erkennung durch den spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) sind nicht alle Aminosäuren von Bedeutung. Nur bestimmte Aminosäuren an definierten Positionen sind für die Interaktion des Peptids mit dem HLA-Molekül, andere mit dem TCR essentiell. Um diese Kontaktpositionen zu detektieren, wurden L-Alanin-Scans durchgeführt. Bei diesen Proliferationstests wurden Peptide verwendet, bei denen, ausgehend vom Minimalepitop p563-575, jede Aminosäure systematisch durch L-Alanin ersetzt wurde. Ursprünglich vorhandenes L-Alanin (A) wurde durch L-Glyzin (G) ausgetauscht.



D. Ergebnisse

Abbildung D.2.4.a: Effekte auf das Stimulationspotential durch Peptidanaloga des Epitops p563-575 nach systematischem Austausch der einzelnen Aminosäuren durch L-Alanin. Hier am Beispiel des Klons 40/2#38.

Die Graphik D.2.4.a zeigt das Ergebnis des Alanin-Scans am Beispiel des TCC 40/2#38. Nach Austausch der beiden endständigen Aminosäuren Asparagin N (563) und Prolin P (564) im aminoterminalen Bereich und Leucin L (574) und Isoleucin I (575) im carboxyterminalen Bereich durch L-Alanin A blieb die Proliferation erhalten. Auch das Histidin H (568) im mittleren Bereich des Minimalpeptids hatte keinen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der T-Zellen. Der Austausch aller weiteren acht Aminosäuren führte zum fast vollständigen Abbruch der Proliferation. Die Aminosäuren, die bei der Interaktion des T-Zellrezeptors mit dem HLA-Peptidkomplex eine Rolle spielten, waren somit Alanin A (565), Alanin A (566), Threonin T (567), Glutamin Q (569), Asparaginsäure D (570), Isoleucin I (571), Asparaginsäure D (572) und Phenylalanin F (573).

Unterstrichen sind die Aminosäuren des Minimalepitops p563-575, die für die Bindung an das HLA-Molekül und die Erkennung durch den TCR der GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 essentiell sind.

N P A A T H Q D I D F L I

Dieser L-Alanin-Scan gibt keine Information darüber, welche dieser acht Aminosäuren nun für die Bindung an das HLA oder welche für die TCR-Erkennung von Bedeutung sind. Diese Frage kann in einem in vitro Bindungstest mit markierten Peptiden, die an isolierte HLA-Moleküle binden, geklärt werden. Um diesen Test durchführen zu können, mußte zunächst geklärt werden, welches Restriktionselement das GAD-Peptid präsentiert.

D.3. Restriktionselement

Das nächste Element, das in die Interaktion mit dem T-Zellrezeptor involviert ist, ist das Haupthistokompatibilitätsantigen (major histo-compatibility complex MHC). Dieses Molekül präsentiert das antigene Peptid auf der Zelloberfläche. Die MHC's, beim Menschen humane Leukozyten-antigene (HLA) genannt, werden in zwei Familien eingeteilt. Moleküle des HLA-Klasse-I-Komplexes (HLA-A, HLA-B, HLA-C) interagieren in der Regel mit CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, MHC-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, -DQ, -DP) mit T-Helfer-Zellen, die CD4 auf der Oberfläche exprimieren.

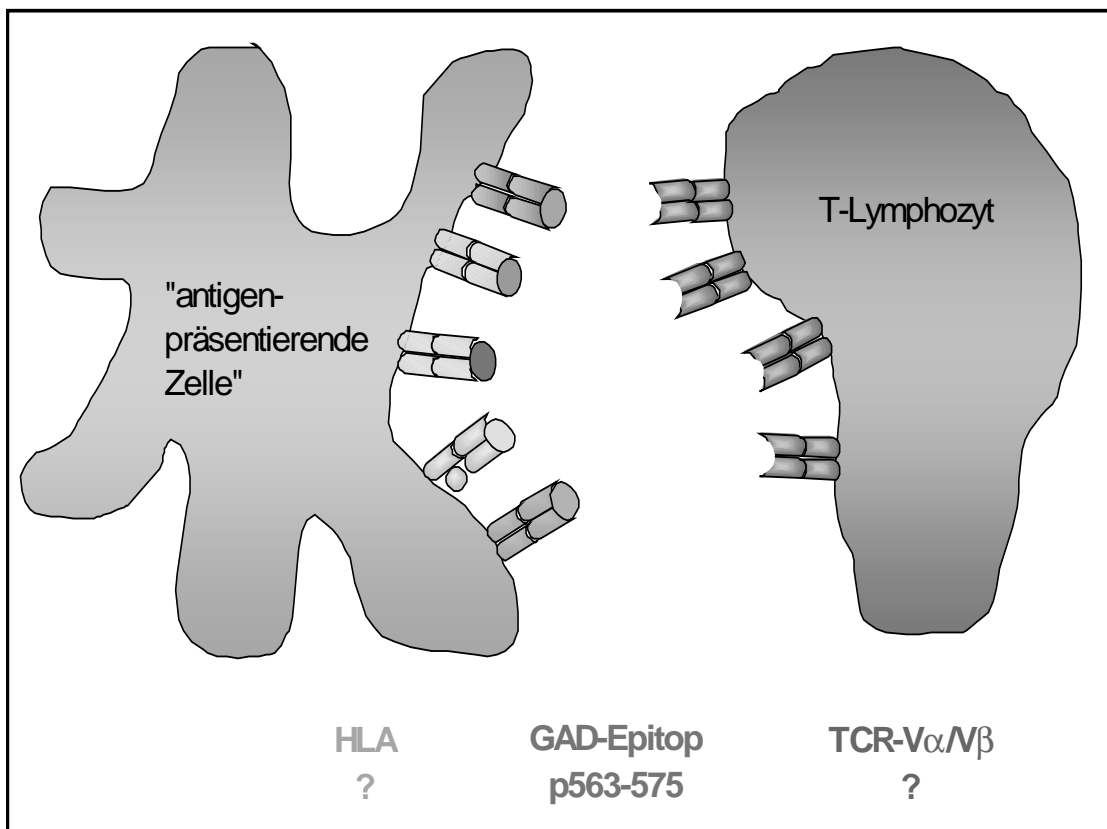


Abbildung: Darstellung der HLA-Antigen Interaktion mit dem T-Zellrezeptor nach Definition des, von den GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 erkannten Epitops.

Wie in Kapitel D.1.2. zu sehen war, handelt es sich bei den GAD-spezifischen T-Zellen um CD4- positive Zellen. Dies ist eine erste

Indikation dafür, daß sie das Antigen in Restriktion mit einem MHC-Molekül der Klasse II erkennen. Dieser Hinweis wurde genauer untersucht und die entsprechende Untergruppe, die das antigene Peptid präsentiert, spezifiziert.

D.3.1. Stimulation durch verschiedene HLA-Moleküle

Wie in Kapitel D.1. erwähnt, wurden die TCC mit PBL restimuliert, die von einem Kontrollspender stammen, dessen HLA-Haplotypen mit denen des Patienten weitgehend übereinstimmten. Da es sich bei diesen Klonen um CD4-exprimierende T-Zellen handelt, wurde im besonderen auf die Übereinstimmung der Klasse-II-Allele geachtet. Da die Prädisposition für Diabetes mit HLA-DR und -DQ in Verbindung gebracht wird, lag das Hauptaugenmerk bei der Auswahl der Kontrollspender auf diesen beiden Allelen. Der Patient 40 ist homozygot in der Expression von HLA-DRB1*0401 und HLA-DQB1*0302, was ein hohes Risiko für eine Diabeteserkrankung darstellt. Der Kontrollspender Kp3 ist heterozygot für DR und DQ. Er exprimiert HLA-DRB1*0301/*0401 und HLA-DQB1*0201/*0302. Somit könnte er durch die Übereinstimmung des DR4`s oder des DQ3`s mit dem Patienten in der Lage sein, dessen T-Zellen zu stimulieren.

Um das Restriktionselement noch enger einzugrenzen, wurden PBL weiterer Kontrollspender herangezogen, die sich in ihrem HLA-Expressionsmuster vom Patient 40 unterschieden. Ihr Stimulationspotential wurde dann im Proliferationstest bestimmt. Vier der ausgewählten Spender exprimieren verschiedene DR4-Subtypen, drei exprimieren DR7 und weitere vier Spender exprimieren DR-Allele, die vollständig von DR4 und DR7 abweichen. Das Proliferationsverhalten der TCC nach Stimulation mit den verschiedenen Kontrollspendern ist am Beispiel des Klons 40/2#38 in Abbildung D.3.1.a dargestellt.

D. Ergebnisse

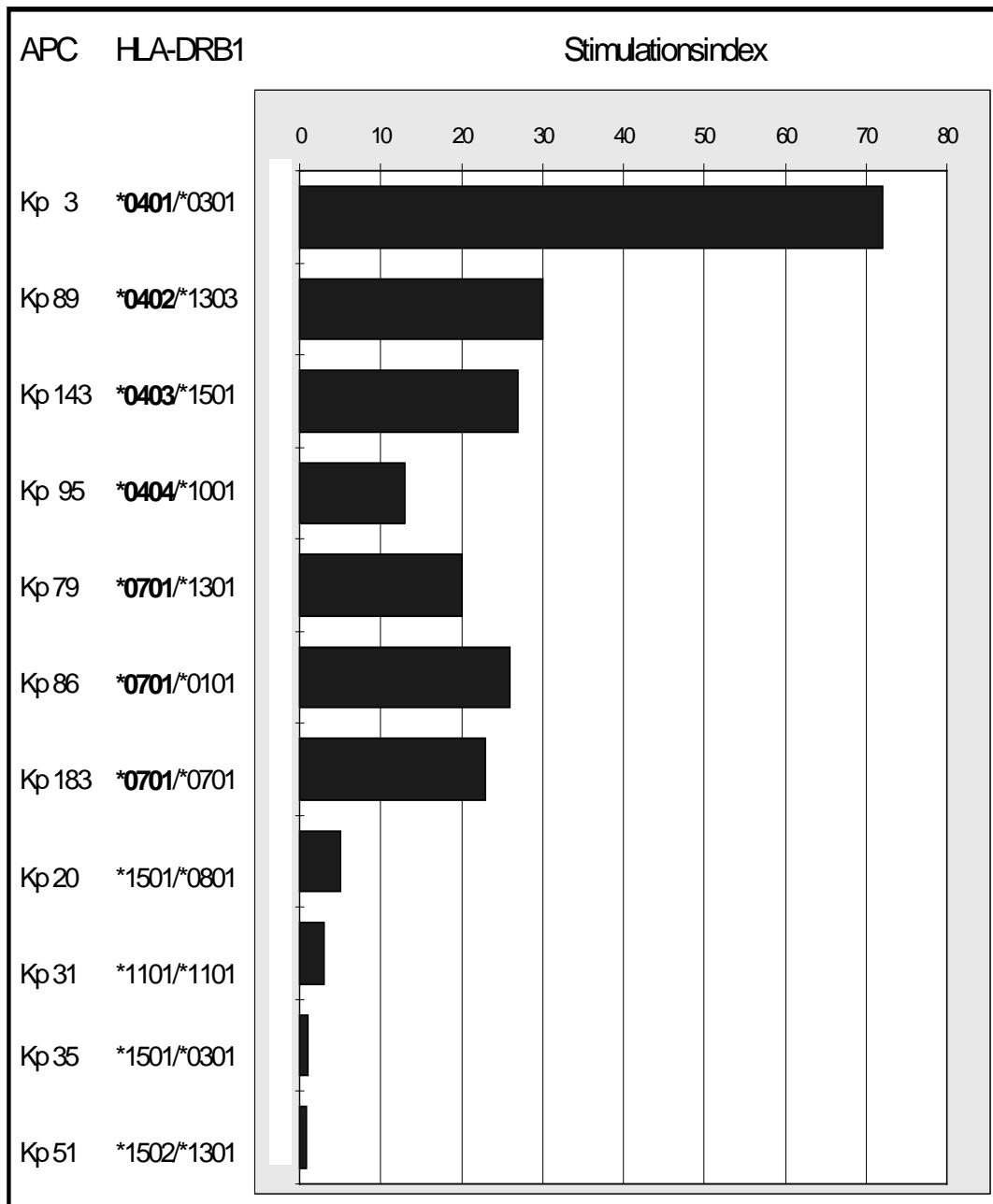


Abbildung D.3.1.a: Darstellung des Stimulationspotentials von PBL aus verschiedenen Kontrollspendern mit unterschiedlichen HLA-Klasse-II-Haplotypen auf den Klon 40/2#38.

PBL des Kontrollspenders Kp3, die, wie auch Patient 40, HLA-

D. Ergebnisse

DRB1*0401 exprimieren, stimulierten den Klon 40/2#38 in diesem Proliferationstest mit einem Stimulationsindex (SI) von 72. Die PBL der Spender, die andere DR4-Subtypen exprimieren, erreichten dennoch einen Stimulationsindex von knapp der Hälfte. Dieser Rückgang des Stimulationspotentials könnte zum einen an der Expression der von DRB1*0401 abweichenden DR4-Subtypen liegen, zum anderen auch daran, daß es sich um ältere PBL-Präparate handelt, die bereits mehrere Jahre in Stickstoff gelagert waren. Die PBL des Kp3 wurden ständig frisch präpariert. Auch die PBL der DRB1*0701-exprimierenden Spender (ebenfalls länger eingefrorene PBL-Präparate) waren in der Lage, die GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 in gleicher Weise zu stimulieren, wie die DR4-Subtypen-exprimierende Spender. Das heißt der Stimulationsindex dieser PBL lag bei ca. 30. PBL von Spendern, die weder DR4 noch DR7 exprimierten, zeigten nur sehr geringe, bzw. einen vollständigen Abbruch der Proliferation.

Wie in Tabelle D.3.1.b zu sehen ist, exprimieren alle Kontrollspender, die DR4 Allele tragen (Kp3, 89, 143, 95) auch DQB1*0302. Das Stimulationspotential der einzelnen PBL scheint dennoch nicht mit der Expression der DQ-Allele zusammenzuhängen, da die DR7-positiven Spender (Kp79, 86, 183) dieses Allel nicht exprimieren und trotzdem in der Lage waren die T-Zellen zu stimulieren.

Das Stimulationspotential ist daher den DR-Allelen zuzuordnen. Die Expression bestimmter DQ-Allele bei der Stimulation der TCC des Patienten 40 haben keine bzw. nur sekundäre Bedeutung.

GAD-spezifische TCC und TCL der Patienten 6 und 24, die im Labor von Dr. Endl etabliert wurden, konnten ebenfalls als DR restringiert identifiziert werden (Endl et al., 1997).

D. Ergebnisse

Kontrollspender	HLA Klasse II Allele		
	DRB1*	DQA1*	DQB1*
Kp3	0401/0301	0301/0501	0302/0201
Kp89	0402/1303	0301/0501	0302/0301
Kp143	0403/1501	0301/0102	0302/0602
Kp95	0404/1001	0301/0101	0302/0501
Kp79	0701/1301	0201/0103	0201/0603
Kp86	0701/0101	0201/0101	0201/0501
Kp183	0701/0701	0201/0201	0201/0201
Kp20	1501/0801	0102/0401	0602/0402
Kp31	1101/1101	0501/0501	0301/0301
Kp35	1501/0301	0102/0501	0602/0201
Kp51	1502/1301	0103/0103	0601/0603

Tabelle D.3.1.b: Darstellung der HLA-Klasse-II-Haplotypen der im Proliferationstest als PBL eingesetzten Kontrollspender.

Wenn, wie ursprünglich angenommen, HLA-DRB1*0401 das Restriktionselement wäre, stellte sich die Frage, weshalb auch PBL, die andere DR4-Subtypen oder auch DR7 exprimieren, in der Lage sind, diese TCC zu stimulieren. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens liegt in der Expression einer zweiten DR- β -Kette. Die Serologie der DR-Allele wird durch die B1-Kette des DR- $\alpha\beta$ -Heterodimers definiert. Parallel zu dieser wird jedoch oft eine

D. Ergebnisse

zweite β -Kette exprimiert, die hoch restringiert mit einem bestimmten B1-Subtypen exprimiert wird und die ebenfalls mit der DR- α -Kette dimerisiert, um ein funktionsfähiges HLA-Molekül auf der Zelloberfläche zu bilden. So wird z.B. neben der B1-Kette der DR4, DR7 und DR9 Allele eine zweite β -Kette, B4 exprimiert. Dieses DRB4-Allel kann in vier verschiedenen Subtypen vorliegen DRB4*0101, *0102, *0103 oder dem Nullallel *01011, wobei die Expression der einzelnen Subtypen nicht mit den einzelnen B1-Allelen assoziiert ist. In der kaukasischen Bevölkerungsgruppe ist DRB4*0103 der am häufigsten vorkommende Subtyp. Synonym wird die DRB4-Kette auch DR53 genannt.

Ob dieses DR53-Molekül in die Präsentation des GAD-Epitops involviert ist, soll im weiteren geklärt werden.

D.3.2. Inhibition mit anti-HLA Antikörpern

Die Erkennung des HLA-Peptid-Komplexes durch den TCR kann im Proliferationstest durch Antikörper, die gegen die einzelnen HLA-Allele gerichtet sind, inhibiert werden. Dies gibt dem Experimentator die Möglichkeit, die HLA-Allele zu definieren, die bei dieser Erkennung eine Rolle spielen.

Im folgenden Proliferationstest mit dem Klon 40/2#38 wurden die PBL des Kp3 mit verschiedenen, gegen HLA-Allele gerichtete Antikörper inkubiert, noch bevor das antigene Peptid zugegeben wurde. Damit sollte die Bindung des Peptids durch vorherige Bindung des Antikörpers am HLA-Molekül blockiert werden, was die Erkennung durch den TCR und die Stimulation der T-Zellen unterbinden sollte. Die Antikörper wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen zugegeben (5 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$), da die Titrierbarkeit der Inhibition diese Annahme nochmals bestätigt.

D. Ergebnisse

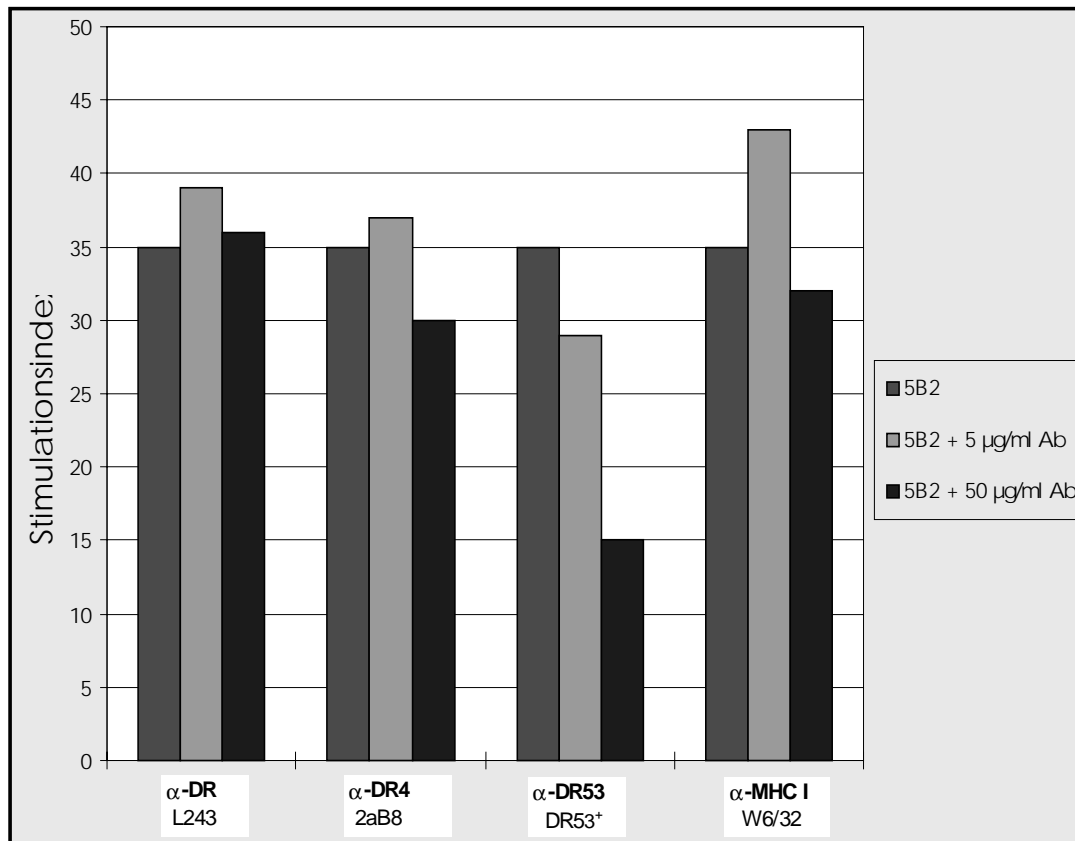


Abbildung D.3.2.a: Proliferationstest zur Definition des Restriktionselements. Die PBL des Kp3 wurden mit verschiedenen gegen HLA gerichteten Antikörper inkubiert, die durch ihre Bindung die Erkennung des Peptids und dadurch die Stimulation des Klons 40/2#38 unterbinden sollten. Zur Inhibition der HLA-DR4-Moleküle diente der mAk 2aB8, der HLA-DR53-Moleküle der mAk DR53+ und zur Blockierung aller HLA-DR Subklassen der pan-DR mAk L243. Als Isotypkontrolle diente der HLA-Klasse-I-spezifische mAk W6/32.

Die Zugabe des anti-DR53⁺ Antikörpers, der gegen das DRB4- $\alpha\beta$ -Heterodimer gerichtet ist, zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation (Abb. D.3.2.a). Dies war ein Hinweis dafür, daß dieses Molekül an der Erkennung durch den TCR beteiligt ist. Dagegen war der gegen DR4 (DRB1*0401- $\alpha\beta$ -Heterodimer) gerichtete 2aB8-Antikörper nicht in der Lage, die Stimulation des Klons 40/2#38 signifikant zu inhibieren. HLA-DR4 schien daher nicht in die Präsentation des GAD-Peptids involviert zu sein. Die Zugabe des pan-DR-Antikörpers L243 führte ebenfalls nicht zur Hemmung der T-Zellstimulation, obwohl er, wie im FACS mit HLA-DR53-transfizierten

D. Ergebnisse

Mausfibroblasten gesehen wurde (Daten nicht gezeigt), auch die DR-Heterodimere mit der B4-Kette, also auch DR53 erkennt. Daß er in diesem Experiment dennoch nicht inhibiert, könnte dadurch erklärt werden, daß die Affinität dieses Antikörpers für die B1-Kette um ein vielfaches höher ist als für die B4-Kette und der Antikörper nur dann an die B4-Kette bindet, wenn kein anderes DR-Allel vorliegt.

Der anti-MHC-I-Antikörper W6/32 diene zum einen als Isotypkontrolle um zu zeigen, daß bereits die Anwesenheit eines Antikörpers des entsprechenden Isotyps keinen Einfluß auf die T-Zell-Proliferation hat und zum anderen, daß die Antigen-Präsentation nicht durch MHC-Klasse-I-Moleküle erfolgt.

D.3.2.1. HLA-Expression auf der T-Zell-Oberfläche

Um die Präsenz und die Intensität der HLA-DR53-Expression im Vergleich zur Menge der DRB1*0401-Moleküle (DR4) auf der Oberfläche der GAD-spezifischen T-Zellen zu detektieren, wurde deren Expression durch Immunfluoreszenz im Durchflußzytometer kontrolliert.

Die Färbung des Klons 40/2#38 erfolgte unter Verwendung des HLA-Antikörpers und dessen Detektion mit dem FITC-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper.

Abbildung D.3.2.1.a zeigt die Graphen der mit den HLA-Antikörpern markierten Zellen. 97 % aller T-Zellen werden vom pan-HLA-DR-Antikörper L243 erkannt und zeigen eine hohe DR-Dichte. Unter Verwendung des DR4-spezifischen mAk 2aB8 und des DR53-spezifischen mAk DR53⁺ konnte eine vergleichbare Expressionsrate dieser beiden Allele auf der Zelloberfläche des TCC 40/2#38 detektiert werden.

D. Ergebnisse

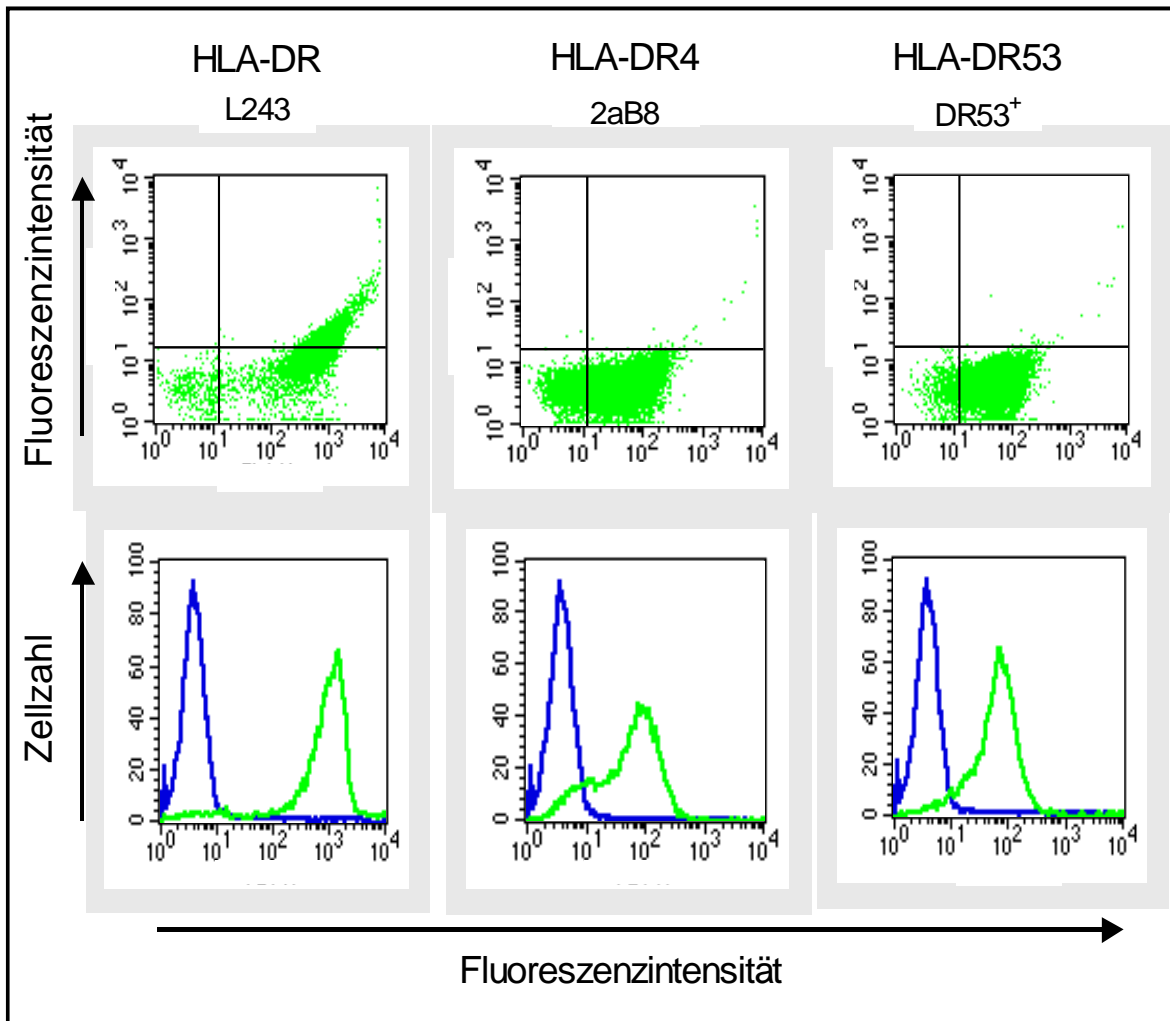


Abbildung D.3.2.1.a: Durchflußzytometrischer Nachweis der auf den GAD-spezifischen T-Zellklonen des Patienten 40 exprimierten HLA-Klasse-II-Moleküle am Beispiel des Klon 40/2#38. Die Detektion der HLA-DR-Moleküle erfolgte durch den pan-DR-spezifischen mAk L243, HLA-DR53 durch den mAk DR53+ und HLA-DR4 durch den mAk 2aB8. Als Isotypkontrolle diente der mAk UPC10.

D.3.2.2. Einfluß der HLA-Antikörper auf die T-Zellen

Einen weiteren Beweis dafür, daß die hier verwendeten Antikörper keinen Einfluß auf die Proliferation haben, z.B. durch direkte Bindung an die T-Zellen, die auch selbst Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, liefert ein Proliferationstest mit dem Klon 40/2#38, bei dem die PBL des Kp3 zwar

D. Ergebnisse

mit den verschiedenen Antikörpern, nicht aber mit Peptiden inkubiert worden waren.

Abbildung D.3.2.2.a zeigt wie erwartet, keine Stimulation der T-Zellen mit PBL, die kein antigenes Peptid HLA-restringiert präsentieren. Der Stimulationsindex lag bei allen Antikörpern unter 1,5.

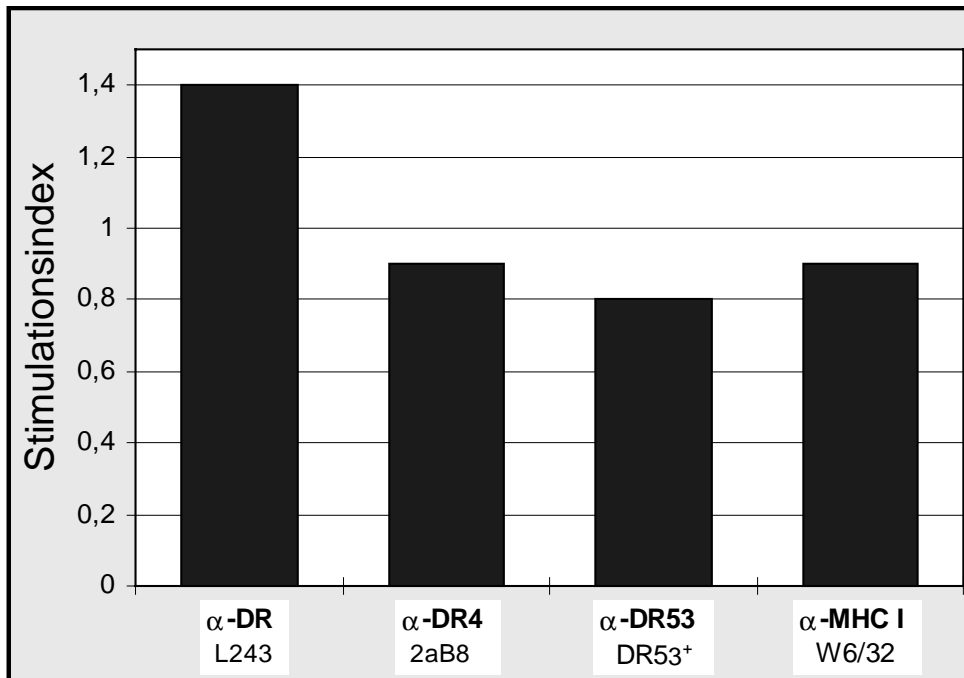


Abbildung D.3.2.2.a: Zur Kontrolle des Einflusses der HLA-spezifischen Antikörper auf die T-Zellstimulation wurden die PBL des Kp3 im Proliferationstest ohne Zugabe des antigenen Peptids mit den verschiedenen mAk's inkubiert.

D.3.3. DR53-transfizierte Mausfibroblasten stimulieren den GAD-spezifischen T-Zellklon

Um den Hinweis auf die Beteiligung des DR53-Allels an der Antigenpräsentation aus den Inhibitionsexperimenten mit anti-HLA-

D. Ergebnisse

Antikörpern zu bestätigen, wurden noch weitere Proliferationstests durchgeführt. Als antigen-präsentierende Zellen dienten sog. L-Transfektanten. Dies sind Mausfibroblastenlinien, die mit humanen HLA-Genen transfiziert wurden. Die Expression des jeweiligen HLA-Moleküls auf der Zelloberfläche wurde regelmäßig durchflußzytometrisch mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper kontrolliert. Der Vorteil dieser Zellen ist, daß sie neben den eigenen murinen MHC-Klasse-I-Molekülen, nur das eine humane MHC-Klasse-II-Molekül exprimieren, mit dem sie transfiziert wurden. So ist es möglich, die Präsentation des Antigens eindeutig einem bestimmten HLA-Allel zuzuweisen.

Die L-Transfektanten wurden nach Inkubation mit dem antigenen GAD-Peptid p563-575 bestrahlt und anschließend mit den T-Zellen zusammengeführt. Zur Stimulation des Klons 40/2#38 wurde die L-Zelllinie BL13 eingesetzt, die mit dem HLA-DRB4*0101 (DR53) Gen transfiziert ist und somit DRB4- $\alpha\beta$ -Heterodimere auf der Zelloberfläche exprimiert. Um die Beteiligung der DRB1*0401-Moleküle (DR4) an der Antigenpräsentation auszuschließen, wurde parallel die L-Transfektante DAP-3-DR4 verwendet, die HLA-DRB1*0401-kodierte Produkte auf der Oberfläche exprimiert. Als Kontrolle wurde, wie gewohnt, mit den PBL von Kp3 stimuliert. Das GAD-Peptid wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um durch dessen Titrierbarkeit die Richtigkeit des Ergebnisses zu evaluieren.

Die T-Zellen des Klons 40/2#38 konnten, abhängig von der Peptidkonzentration, durch die BL13-Zellen stimuliert werden (Abb. D.3.3.a). Der Stimulationsindex lag bei 50 nM eingesetztem Peptid bei 10, bei 500 nM Peptid bei 40 und bei einer Peptidkonzentration von 5 μ M lag der Stimulationsindex bei 60.

D. Ergebnisse

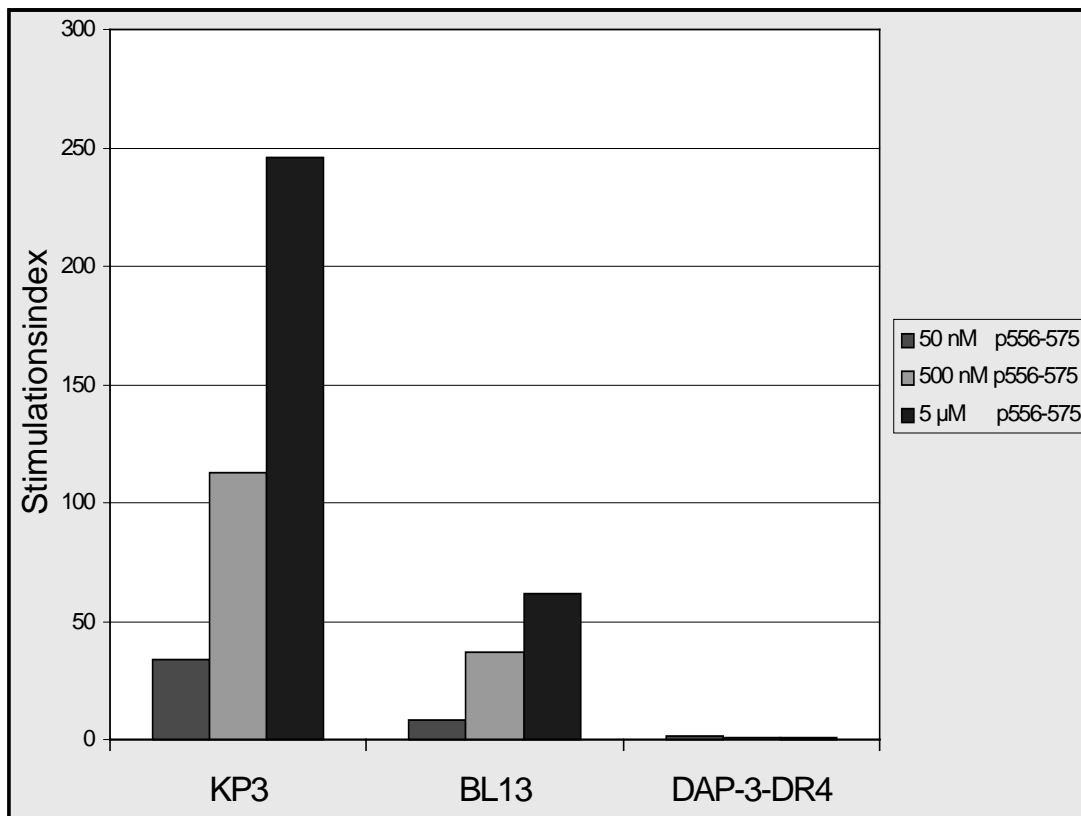


Abbildung D.3.3.a: Stimulation des Klons 40/2#38 durch Mausfibroblastenlinien, die mit HLA-DR transfiziert sind. Die sog. L-Zelllinie BL13 exprimiert HLA-DR53 auf der Zelloberfläche und ist in der Lage, diesen T-Zellklon zu stimulieren; die DR4-exprimierende Linie DAP-3-DR4 nicht. Als Kontrolle wurde mit PBL des Kp3 stimuliert.

Da diese L-Transfektanten ausschließlich humane HLA-DR53-Moleküle tragen, ist hiermit die Beteiligung von HLA-DR53 (DRB4*01) an der GAD-Präsentation eindeutig bewiesen.

L-Transfektanten mit DRB1*0401-Allelen auf der Oberfläche, DAP-3-DR4, vermochten diese Zellen nicht zu stimulieren. Unabhängig von der eingesetzten Peptidkonzentration konnten die T-Zellen nicht zur Proliferation angeregt werden.

Dennoch war die Proliferation nach Stimulation mit PBL von Kp3 am

größten. Diese stieg mit zunehmender Peptidkonzentration auf einen Stimulationsindex von 250 bei der höchsten Peptidmenge von 5 μM . Die Fähigkeit der PBL, die T-Zellen in weitaus höherem Maße zu stimulieren als die L-Transfektanten, lag wohl in erster Linie daran, daß die PBL professionelle, die Transfektanten hingegen nicht-professionelle antigen-präsentierende Zellen sind. Hier kommt der Einfluß von kostimulatorischen Adhäsionsmolekülen, die speziesspezifisch mit T-Zellen interagieren, zum Tragen, die für eine optimale Stimulation von wesentlicher Bedeutung sind.

D.3.3.1. Inhibition der transfektantenvermittelten Stimulation durch anti-HLA-Antikörper

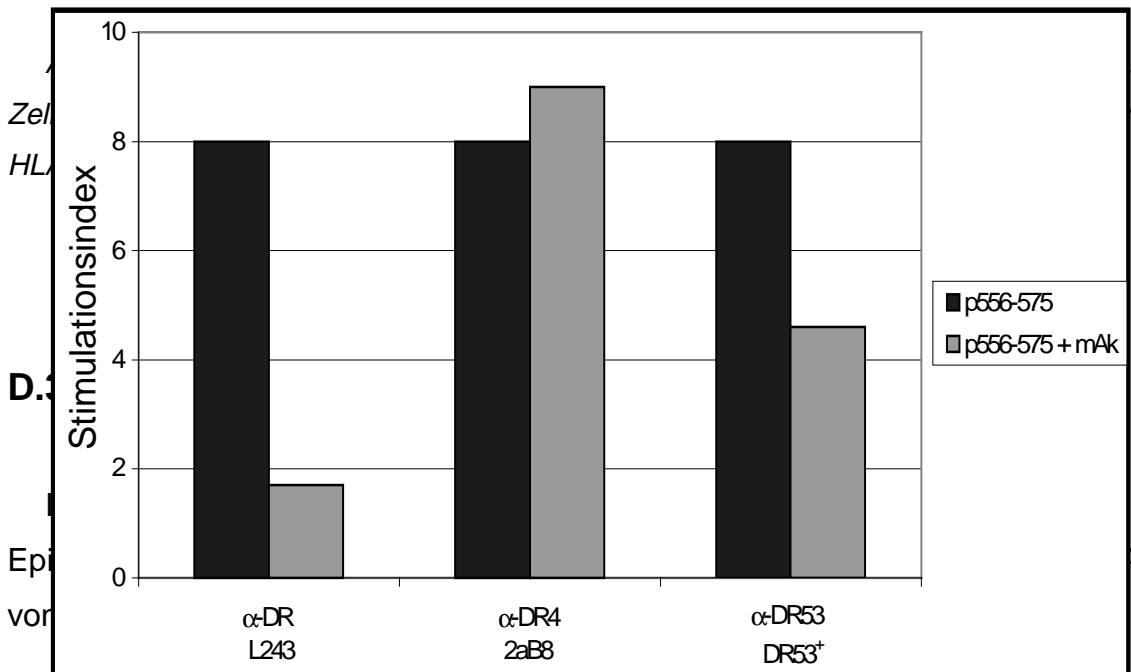
Die Inhibierbarkeit der Stimulation durch die DR53-transfizierten Mausfibroblastenlinie BL13 durch verschiedene, gegen HLA gerichtete Antikörper, liefert einen zusätzlichen Beweis für die Involvierung von DR53 an der Antigenpräsentation.

In einem Proliferationstest wurden die BL13-Zellen, noch bevor das Peptid p563-575 zugegeben wurde, mit Antikörpern inkubiert, welche die Bindung des Peptids an das HLA-Molekül blockieren sollten. Abbildung D.3.3.1.a zeigt, daß der mAk $\alpha\text{-DR53}^+$, die Stimulation der T-Zellen durch Blockierung des DR53-Moleküls um ca. die Hälfte inhibierte. Dieser Antikörper konnte, wie bereits in Kapitel 3.2 dargestellt, die Stimulation der T-Zellen durch PBL ebenfalls nur um ca. 50% inhibieren, was einerseits auf eine relativ geringe Affinität für das DR53-Molekül zurückzuführen sein könnte, oder aber die Bindungsstelle des Antikörpers am Molekül blockiert die Peptidbindung nicht vollständig, so daß das Bindungspotential trotz gebundenem Antikörper noch relativ hoch ist.

Dagegen ist der pan-DR mAk L243 in der Lage die BL13-Stimulation fast vollständig zu inhibieren. Die Zugabe des DR4-spezifischen 2aB8 mAk's hat auf die Proliferation des Klons 40/2#30 keinen Einfluß, da die BL13 Linie kein DR4 exprimiert und auch keine unspezifische Bindung des Antikörpers stattfindet.

D. Ergebnisse

Hiermit ist also eindeutig bewiesen, dass die Präsentation des GAD-Epitops p563-575 in Restriktion mit dem HLA-DR53-Molekül (DRB4*01) ausreicht, um die GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 zu stimulieren.



Im Proliferationstest konnte zwar gezeigt werden, daß nach Austausch von acht Aminosäuren des 13mers NPAATHQDIDFLI das Stimulationspotential der TCC sank, welche AS dabei an den TCR, welche an das HLA-Molekül binden, blieb jedoch offen.

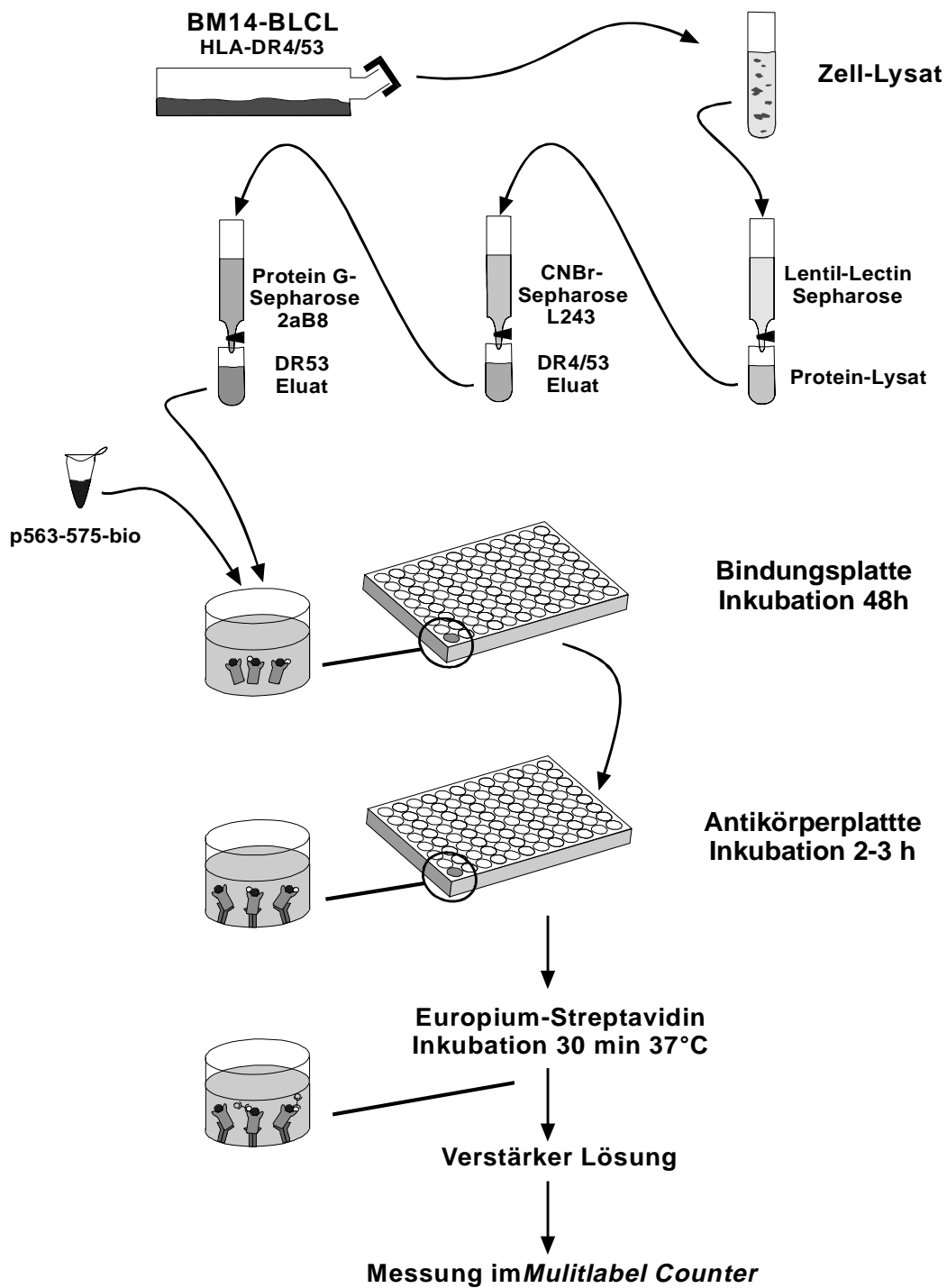
Die Interaktionen des Peptids p563-575 mit dem HLA-DR53 Molekül sollten in einem in vitro Bindungstest analysiert werden. Dieser Test basiert auf der Immunpräzipitation des HLA-Moleküls durch einen DR53-spezifischen Antikörper, der an einer Festphase fixiert ist. Das an HLA bindende biotinylierte Peptid kann in diesem Test durch Europium-markiertes Streptavidin detektiert werden. Durch Konkurrenz mit den unmarkierten Ala-scan Peptiden aus Kapitel D.2.4. wäre es möglich, die für die Bindung essentiellen AS zu definieren. Ein unmarkiertes Peptid, das die gleiche Affinität zum HLA-Molekül besitzt wie das biotinylierte Ursprungspeptid p563-575 würde mit diesem um die Bindung an HLA konkurrieren und somit das Europiumsignal herabsetzen. Ein Ala-scan Peptid, bei dem eine für die Bindung essentielle AS durch Alanin

D. Ergebnisse

ausgetauscht wird, könnte in Folge nicht mehr an HLA binden; das Europiumsignal des biotinylierten Peptids bliebe unverändert.

Der Versuchsablauf ist in folgender schematischer Darstellung veranschaulicht.

HLA-Peptid Bindungstest



Schematische Darstellung der im Text beschriebenen HLA-DR53-Isolierung und des HLA-Peptid Bindungstests.

D.3.4.1. Isolierung von HLA-DR53-Molekülen aus einem Zellysat

Die für diesen Test benötigten HLA-DR53-Moleküle wurden aus der DR4/DR53-homozygoten Lymphoblastoiden Zelllinie BM14 isoliert. Das mit Hilfe eines Detergenz gewonnene Zellysat wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt. Nach der unspezifischen Bindung der im Lysat enthaltenen Proteine an Lentil-Lectin-Sepharose wurden die HLA-DR-Moleküle durch den an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelten L243 Antikörper isoliert. Das hierbei gewonnene DR4/DR53-Gemisch wurde über den, an Protein-G-Sepharose gekoppelten DR4-spezifischen 2aB8-Antikörper geschickt, um die DR53-Moleküle durch Negativfraktionierung anzureichern.

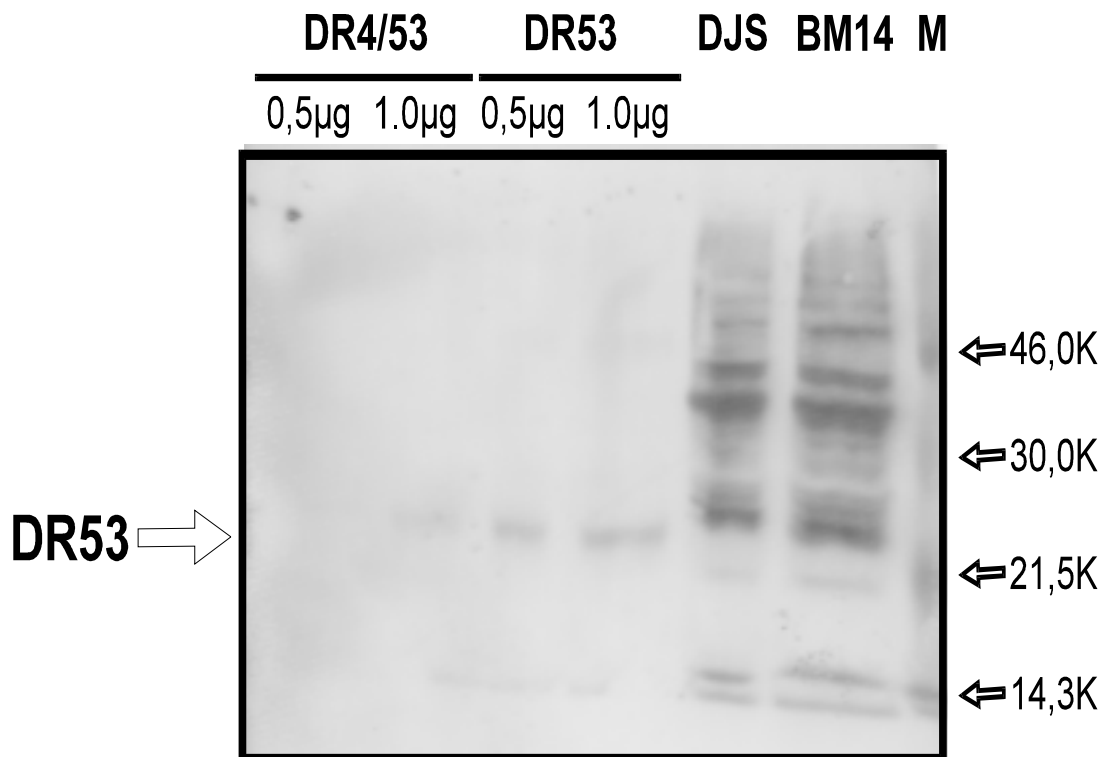


Abbildung D.3.4.1.a: Western blot. In den Spuren A und B wurden 0,5, bzw. 1 µg Protein des DR4/53-HLA-Gemischs aufgetragen. In den Spuren C und D 0,5, bzw. 1 µg HLA-DR53. Die Spuren E und F dienen als Kontrolle, mit den Zellysaten der BLCL DJS und BM14. Ganz rechts wurde ein Proteingrößenmarker aufgetragen.

Das Vorhandensein von HLA- DR53 Molekülen im Isolat wurde im

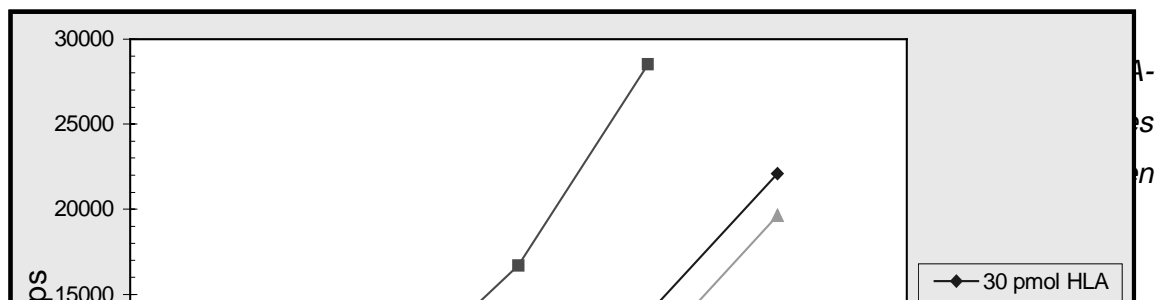
D. Ergebnisse

Western Blot nachgewiesen (Abb. D.3.4.1.a). Dabei wurden das Eluat der L243-gekoppelten Säule, das ein DR4/DR53-Gemisch enthalten sollte und das Eluat der 2aB8-gekoppelten Säule mit dem angereicherten DR53, auf ein 10% SDS-PAGE aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der DR53-Moleküle erfolgte über den spezifischen mAk DR53⁺ und einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper.

Abbildung D.3.4.1.a zeigt die detektierten HLA-DR53 Moleküle im Western Blot. In den Spuren A und B wurde das DR4/DR53-Gemisch mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen aufgetragen. Der DR53-Anteil dieser Fraktion war zu gering, um im Western detektiert zu werden. Das in verschiedenen Mengen aufgetragene DR53-Eluat zeigt nach Trennung der beiden DR-Allele ein deutliches Signal in den Spuren C und D. Als Kontrolle wurde in den Spuren E und F Zellysate aufgetragen. Das Lymphoblastom BM14 ist DR53-positiv und sollte im Western ein positives DR53-Signal zeigen (Spur F). Das DR53-negative Lymphoblastom DJS sollte nicht detektiert werden. Daß in diesen beiden Spuren dennoch mehrere Banden zu sehen sind, liegt wahrscheinlich an der zu hohen Proteinmenge und der daraus resultierenden unspezifischen Bindung des Antikörpers.

D.3.4.2. Bindungstest

Das an HLA-DR53 gebundene biotinylierte Peptid p563-575 wurde durch Europium-markiertes Streptavidin detektiert. Nach Austesten verschiedener HLA- und Peptidmengen erwies sich eine HLA-Konzentration von 15 pmol und eine Peptidkonzentration von 200 pmol als am günstigsten. Abbildung D.3.4.2.a zeigt die Titration der Peptidmenge bei HLA-DR53-Konzentrationen von 15 und 30 pmol.



D. Ergebnisse

Konzentrationen 30 pmol (blaue Linie) und 15 pmol (rote Linie) eingesetzt. Als Kontrolle wurde das Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen ohne HLA (grüne Linie) inkubiert.

Optimale Detektionsbedingungen konnten leider nicht erreicht werden, da der Hintergrund, d.h. die Detektion des biotinylierten Peptids an sich, zu hoch war. Dieser Effekt resultierte vermutlich aus einer unspezifischen Bindung des Peptids an die Gefäßwand und war auch durch unterschiedliche Blockierungsreagenzien nicht zu unterbinden. Das spezifische Signal, das sich aus dem Quotient der Peptidbindung an das HLA-Molekül und der Peptiddetektion ohne HLA-Moleküle (negative Kontrolle) bildete, war daher zu gering, um signifikante Ergebnisse zu liefern. Der Einsatz der Ala-scan Peptide als Kompetitoren zeigte sich als wenig erfolgreich, da das ohnehin geringe spezifische Signal mit noch weniger deutlichen Signalen nicht mehr auswertbar war.

Um das Problem der Peptidbindung an die Gefäßwand der Mikrotiterplatte zu umgehen, sind Bindungstests geplant, die die Bindung des biotinylierten Peptids an zellulär gebundenes HLA detektieren. Die Bindung des Peptids p563-575 an die DR53-transfizierte L-Zelllinie BL13 soll durchflußzytometrisch getestet werden. Als Detektor dient PE-markiertes Streptavidin.

D.4. T-Zellrezeptor

T-Zellrezeptor-Repertoireanalysen wurden durchgeführt, um die Klonalität der etablierten GAD-spezifischen TCC zu verifizieren und um die spezifische Erkennung des HLA-Antigen-Komplexes einem definierten TCR zuzuordnen.

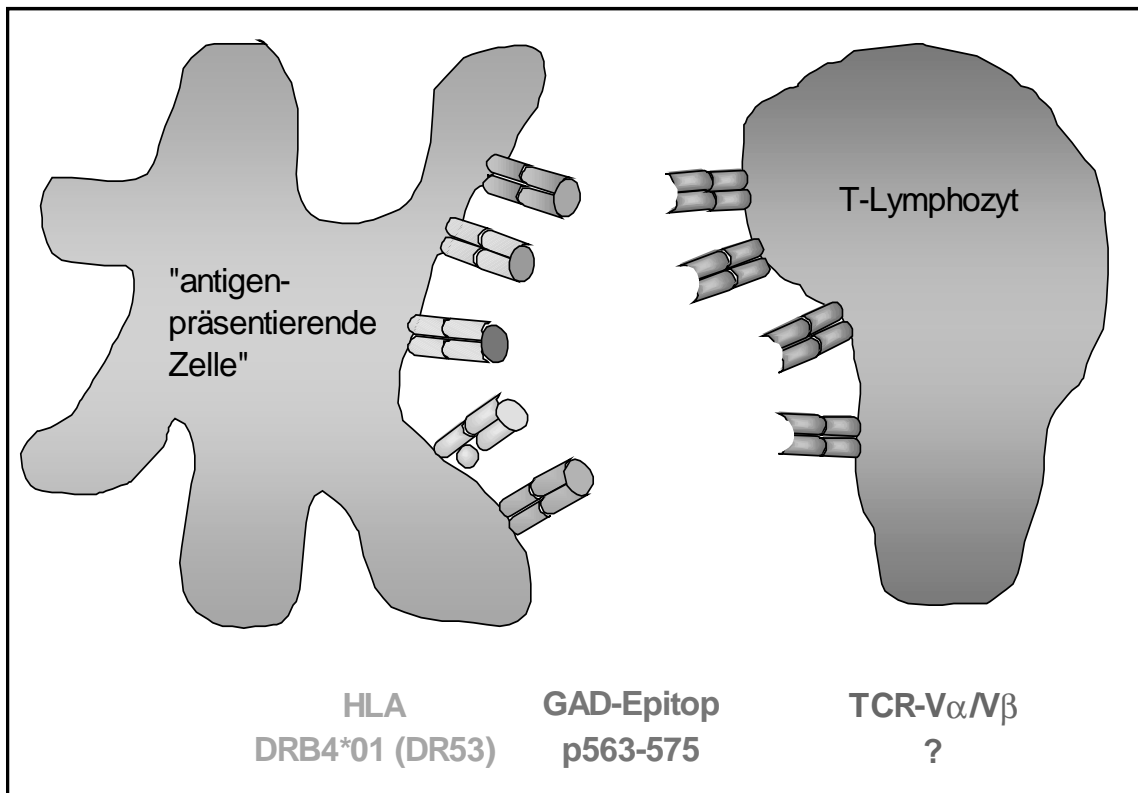


Abbildung: Darstellung der HLA-Antigen Erkennung durch den noch uncharakterisierten TCR der GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40, der das GAD-Epitop p563-575 in Restriktion mit dem HLA-DR53-Molekül erkennt.

Ein T-Zellklon ist durch die Expression eines einzelnen T-Zellrezeptors (TCR) definiert, der aus einem funktionellen $\alpha\beta$ -Heterodimer besteht. Die Spezifität resultiert aus der Umlagerung einzelner TCR-V α - bzw. TCR-V β -Gensegmente an die jeweilige konstante Region des TCR Gens. Zum Nachweis der exprimierten TCR-V α - und TCR-V β - Genen wurde zunächst

D. Ergebnisse

RNA isoliert, diese anhand spezifischer Primer für die TCR-V α - (p-C α ST), bzw. TCR-V β - (p-C β ST) Kette revers transkribiert und anschließend durch eine V-familien-spezifische PCR mit Hilfe gensegmentspezifischer Primer das Expressionsmuster bestimmt. Die spezifische Amplifikation erfolgte durch Bindung eines der 36 TCR-V α - bzw. 34 TCR-V β -spezifischen 5'Primer in Kombination mit dem jeweiligen, an die Konstantregion bindenden 3'Primer der α -Kette (TC α), bzw. β -Kette (3'C β).

Die Funktionalität der PCR-Reaktion wurde in jedem Ansatz durch parallele Amplifikation eines internen Kontrollfragments kontrolliert. Diese erfolgte durch Bindung eines Primerpaars an die Konstantregion der α -Kette (P-5' α ST und P-3' α ST), bzw. der β -Kette (P-5' β ST und P 3' β ST). Die Länge des jeweiligen Kontrollfragments betrug im Falle der α -Kette 549 bp, bei der β -Kette 351 bp.

D.4.1. TCR-Expression der TCC des Patienten 40

Die fünf GAD-spezifischen T-Zellklone des Patienten 40 zeigten eine einheitliche TCR-Expression (Tabelle D.4.1.c, Seite 94).

Nach elektrophoretischer Auftrennung der TCR-V α -PCR-Produkte, zeigte sich in allen 36 PCR-Reaktionen das 549 bp lange Kontrollfragment aus der Konstantregion der α -Kette. Eine spezifische Bande konnte dagegen nur durch Bindung des stark exprimierten V α 2- und des schwach exprimierten V α 21-familien-spezifischen Primers detektiert werden. Dieses Bild reproduzierte sich bei allen fünf TCC 40/2#5, #16, #20, #21 und #38 und ist exemplarisch am Beispiel von 40/2#38 in Abbildung D.4.1.a dargestellt.

D. Ergebnisse

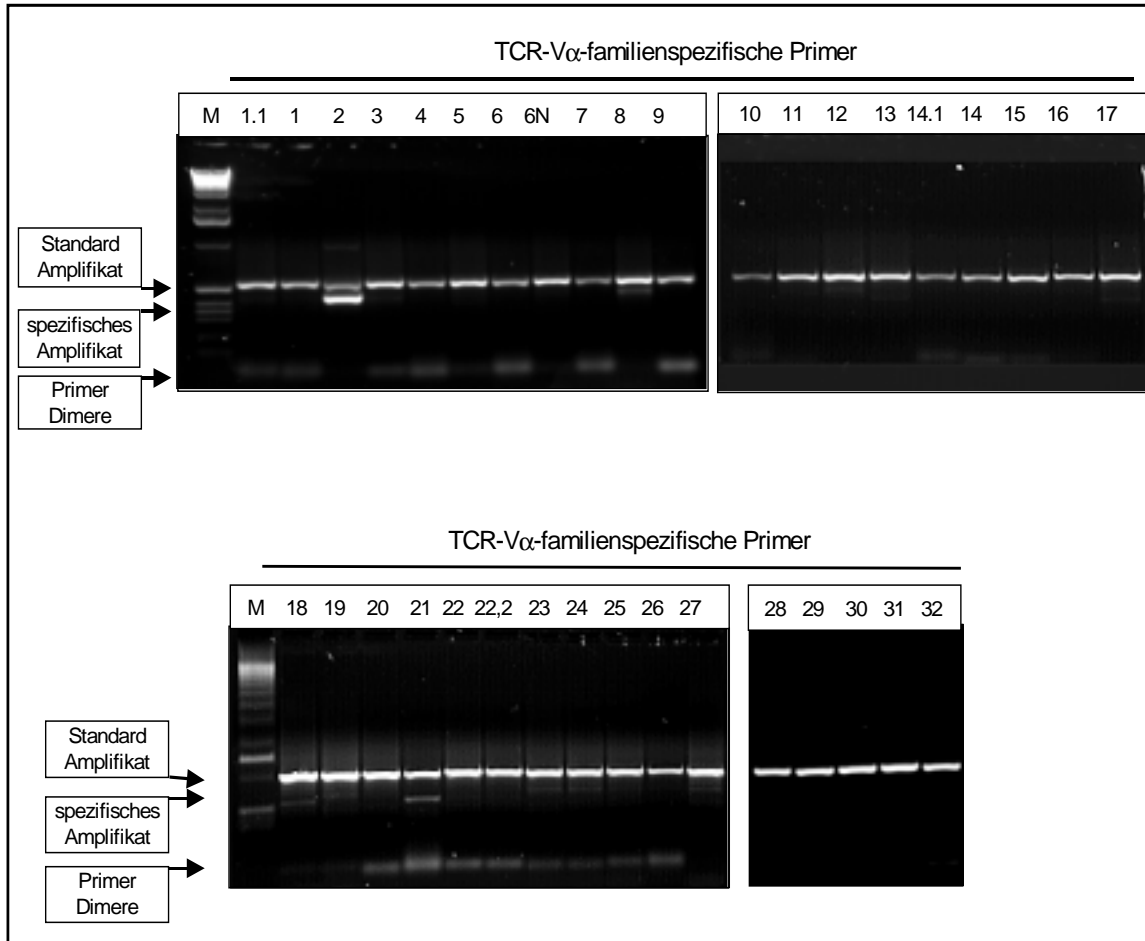


Abbildung D.4.1.a: PCR-Analyse zum TCR-V α -Repertoire des TCC 40/2#38.

In bezug auf die β -Kette wurde bei allen fünf Klonen nur eine V β -spezifische Bande mit dem V β 2-familienspezifischen Primer sichtbar. Das in allen Reaktionen vorhandene C β -Kontrollfragment bestätigt die Effizienz der PCR insgesamt (Abb. D.4.1.b).

D. Ergebnisse

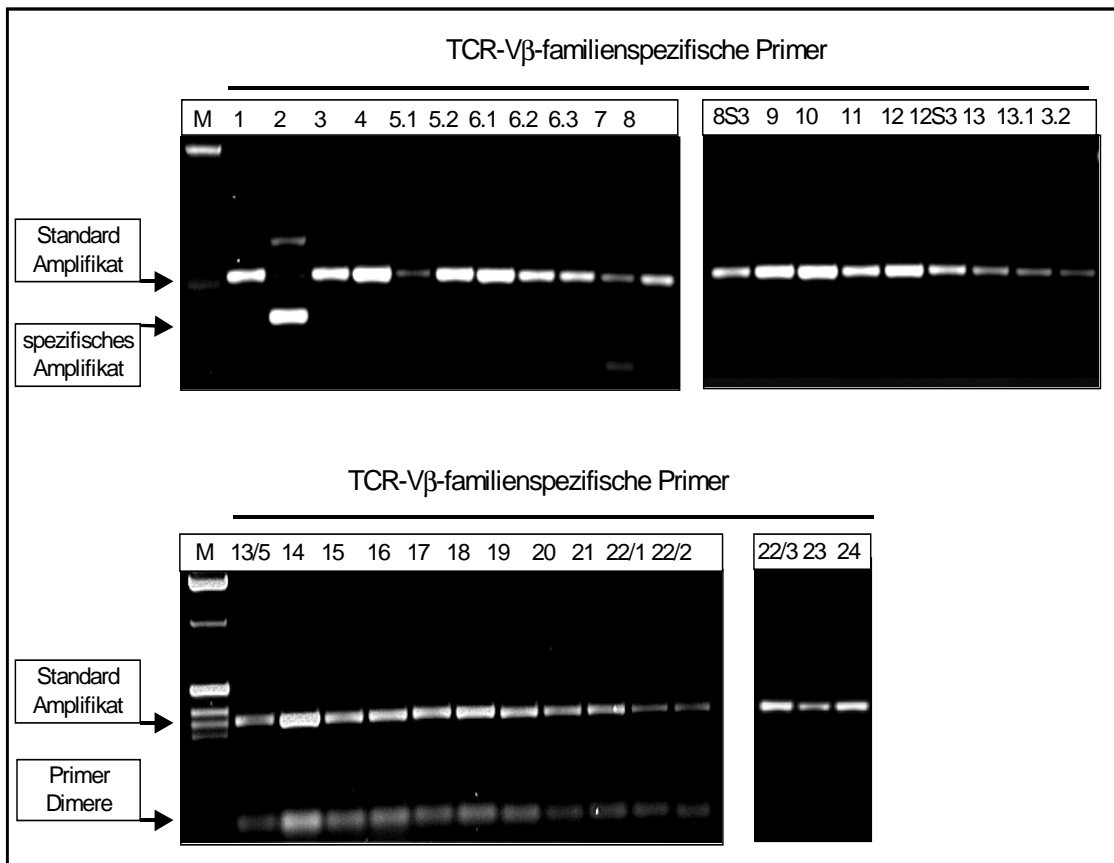


Abbildung D.4.1.b: PCR-Analyse des TCR-V β -Repertoires des TCC 40/2#38.

Das Auftreten einer V β -Kette und zweier V α -Ketten könnte zum einen dadurch erklärt werden, daß es sich bei den fünf T-Zellpopulationen nicht um einzelne Klone handelt, sondern um ein Gemisch aus zwei verschiedenen T-Zellklonen, die zwar die gleiche β -Kette exprimieren, sich aber in der Expression der α -Kette unterscheiden. Das Vorkommen beider T-Zelltypen in allen fünf T-Zellklonen könnte damit zusammenhängen, daß diese sich gegenseitig beeinflussen, z.B. in der Weise, daß die eine T-Zelle die Stimulation der anderen reguliert. Eine weitere Möglichkeit für die Detektion zweier α -Ketten wäre die Expression beider Ketten auf einer T-Zelle, die somit zwei verschiedene TCR auf ihrer Oberfläche trägt. Diese beiden TCR setzen sich zusammen aus den Heterodimeren der V β 2-Kette, jeweils gepaart mit V α 2, bzw. V α 21. Das Vorkommen solcher T-Zellen, die zwei verschiedene TCR

D. Ergebnisse

exprimieren ist relativ häufig und wurde gerade im Hinblick auf eine Funktion bei der Entstehung von Autoimmunität diskutiert (Heath et al., 1993).

TCC	V α		V β
40/2#	2	21	2
40/2#1	2	21	2
40/2#2	2	21	2
40/2#2	2	21	2
40/2#3	2	21	2

Tabelle D.4.1.c: Darstellung der von den fünf T-Zellklonen des Patienten 40 exprimierten TCR-V α - und -V β -Familien.

D.4.1.1. Detektion der TCR-Ketten auf der Zelloberfläche

Um die Expression der TCR α - und β -Ketten, die in der PCR auf RNA-Ebene detektiert wurden, auch auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden durchflußzytometrische Analysen durchgeführt. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen V α 2- und V β 2-spezifische Sequenzen, wurde deren Vorkommen und Häufigkeit am Beispiel des TCC 40/2#38 bestimmt. Ein V α 21-spezifischer Antikörper ist derzeit im Handel leider nicht erhältlich und konnte somit bei dieser Analyse nicht eingesetzt werden.

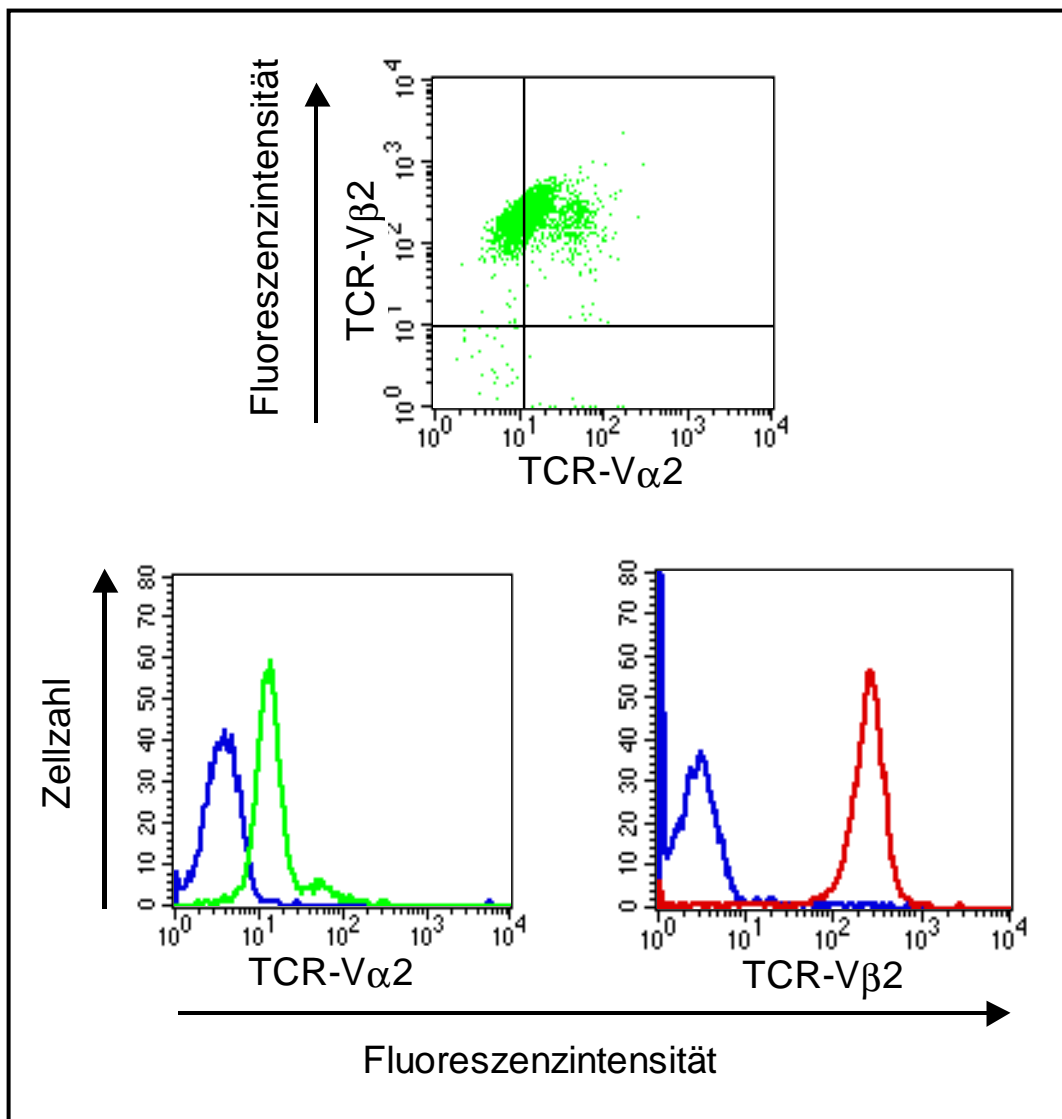


Abbildung D.4.1.1.a: Durchflußzytometrischer Nachweis der $V\alpha 2$ - und $V\beta 2$ -TCR-Ketten auf der Oberfläche der GAD-spezifischen T-Zellklone des Patienten 40 durch Bindung monoklonaler V-Gensegment-familien-spezifischer Antikörper.

Abbildung D.4.1.1.a zeigt die Bindung der beiden TCR-familien-spezifischen Antikörper im Vergleich zu einer Isotypkontrolle, d.h. einem Antikörper des gleichen Isotyps, jedoch einer T-zellunrelevanten Spezifität. Das Integral der Bindung des $V\beta 2$ -spezifischen mAk war deutlich nach rechts verschoben, was auf eine erhöhte Expression der $V\beta 2$ -Kette auf nahezu allen T-Zellen dieses Klons hinweist (Abb. D.4.1.1.a). Im Gegensatz dazu zeigte der gegen $V\alpha 2$

D. Ergebnisse

gerichtete mAk eine schwache Expression dieser V-Familie auf der Zelloberfläche von nur ca. 14% der T-Zellen. Diese Zellen waren doppelpositiv, d.h. sie exprimieren T-Zellrezeptoren, die aus einem $V\alpha 2/V\beta 2$ -Heterodimer bestehen. Die restlichen 85% der $V\beta 2$ -exprimierenden Zellen waren in dieser durchflußzytometrischen Analyse einfach-positiv. Sie sind vermutlich mit der zweiten, in der PCR-Analyse (Kap. D.4.1) nachgewiesenen $V\alpha$ -Kette, $V\alpha 21$, assoziiert. Dieses Ergebnis spricht eher für eine Expression der beiden $V\alpha$ -Ketten auf separaten Zellpopulationen.

D.4.2. Vergleich der $V\alpha$ - und $V\beta$ -Kettenexpression von TCC verschiedener Patienten

Die Relevanz der detektierten T-Zellrezeptoren (TCR) auf GAD-spezifischen T-Zellen sollte evaluiert werden, indem deren Expression auf GAD-spezifischen T-Zellen weiterer Diabetespatienten verglichen wurde. Die TCL und TCC der beiden Patienten 6 und 24, die im Labor von Dr. Endl etabliert worden waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf die jeweilige Expression der TCR hin analysiert. Die Detektion erfolgte auf RNA-Ebene durch PCR-Analysen. Die vier eindeutig als klonal definierten T-Zellen des Patienten 24 exprimierten einen TCR, der aus dem Heterodimer der $V\alpha 8$ - und $V\beta 5$ -Kette besteht.

Aus dem Vergleich der variablen Familien der T-Zellen dieser drei Patienten kann gefolgert werden, daß die GAD-Spezifität nicht der Expression eines bestimmten V-Gensegments zugeordnet werden kann.

In Tabelle D.4.2.a ist eine Auflistung der jeweils exprimierten $V\alpha$ - und $V\beta$ -Gensegmente dargestellt.

D. Ergebnisse

PATIENT	TCL/TCC	$V\alpha$								$V\beta$	
6	6/4	1	8			17		23	24	2	13
	6/7	1	8	14	16	(17)	22	(23)	25		
	6/8	1	8			17	22			2	13
	6/10	1	8	(15)		(17)	(22)			2	13
	6/10#2		8	15		17				2	13
40	40/2#5		2					21		2	
	40/2#16		2					21		2	
	40/2#20		2					21		2	
	40/2#21		2					21		2	
	40/2#38		2					21		2	
24	24/31#1		8							5	
	24/31#4		8							5	
	24/31#7		8							5	
	24/31#9		8							5	

Tabelle D.4.2.a: Tabellarische Auflistung der durch PCR-Analysen detektierten TCR $V\alpha$ - und $V\beta$ -Ketten der GAD-spezifischen T-Zelllinien und -klone die aus den drei Patienten 6, 40 und 24 etabliert worden waren. Die in Klammern gesetzten V-Familien waren nur sehr schwach exprimiert.

Die verschiedenen T-Zelllinien, die aus dem peripheren Blut des Patienten 6 isoliert worden waren zeigten zwar ein eingeschränktes TCR-Repertoire, konnten jedoch anhand der Heterogenität noch nicht als Klone definiert werden. Es kristallisierten sich zwei dominante $V\alpha$ - und $V\beta$ -Gensegmente heraus, die bei allen 4 TCL auftraten und daher mit der Spezifität für GAD in

Zusammenhang gebracht werden konnten. Dabei handelte es sich um die beiden $V\alpha$ -Familien $V\alpha 1$ und $V\alpha 8$, die mit jeweils einer der beiden $V\beta$ -Familien $V\beta 2$, bzw. $V\beta 13$ gepaart zu sein schienen.

D.4.3. Sequenzen der CDR3-Region

Die Erkennung des HLA-Antigenkomplexes erfolgt in erster Linie durch die in der variablen Region kodierten CDR1 und CDR2-Domäne und durch die CDR3-Domäne, welche durch N-Nukleotid-Substitution in der V, (D), J Grenzregion determiniert wird. Der CDR3-Schleife wird vor allem die Bindung an das antigene Peptid zugeschrieben. Daher liefert die Analyse der Aminosäuresequenz dieser Domäne eine wichtige Information für das spezifische Bindungsverhalten eines TCR. Um diese zu untersuchen, wurden die in der PCR erhaltenen Amplifikate anschließend sequenziert.

Die beiden von den Klonen des Patienten 40 exprimierten $V\alpha$ -Ketten und die $V\beta$ -Kette waren identisch bezüglich der CDR3 Länge und der Aminosäure-Zusammensetzung (Abb. D.4.3.a). Dabei zeigte sich, daß alle $V\alpha 2$ -positiven Transkripte das $J\alpha 42$ Gensegment rearrangiert hatten. Die CDR3 Schleife zeigte bei allen eine Länge von neun Aminosäuren, deren Sequenz bei allen Klonen identisch war. Die $V\alpha 21$ -positiven Transkripte stellten sich ebenfalls als identisch dar. Alle TCR verwendeten das $J\beta 39$ Gensegment und eine CDR3 Länge von neun AS und gleicher AS-Sequenz. Die β -Kette zeigte bei allen $V\beta 2$ -Transkripten ein Rearrangement mit $J\beta 1.5$ und eine CDR3-Domäne, die in der AS Länge von acht AS und der Sequenz vollständig identisch war.

D. Ergebnisse

variable Domäne	CDR3-LOOP	joining Domäne
V α 2	N I A G G S Q G N	L I F
C A V TGTGCCGTG	<u>AACATTGCTGGCGGAAGCCAAGGAAAT</u>	CTCATCTTT
J α 42		
V α 21	Q A R G P P G N M	L T F
C A GTGCAG	<u>CAAGCGCGAGGCCCCCAGGCAACATG</u>	CTCACCTTT
J α 39		
V β 2	S A G W S N Q P	Q H F
C S A TGCAGTGCT	<u>AGTGCGGGTTGGAGCAATCAGCCC</u>	CAGCATTTT
J β 1.5		

Tabelle D.4.3.a: Darstellung der aus den PCR-Amplifikaten sequenzierten CDR3-Domänen der Klone des Patienten 40. Dargestellt ist die jeweilige Nukleotidsequenz und die diese kodierende Aminosäuresequenz.

D.4.4. Vergleich der CDR3-Domänen von GAD-spezifischen TCC verschiedener Patienten

Bei den einzelnen TCL bzw. TCC eines Patienten waren die CDR3-Domänen der α -Ketten identisch, sie unterschieden sich jedoch in der Länge und Sequenz zwischen den einzelnen Patienten.

Die TCR der GAD-spezifischen TCC des Patienten 24 waren bei allen vier untersuchten Klonen vollkommen identisch. Bei der α -Kette war V α 8 an J α 30 rearrangiert und sie zeigte die gleiche CDR3-Sequenz von acht AS Länge. Die β -Kette des heterodimeren TCR bestand aus der an V β 5 rearrangierten J β 2.1-Familie. Die AS-Sequenz und die Länge der CDR3-Domäne war bei allen vier identisch.

D. Ergebnisse

TCC variable Domäne CDR3 LOOP joining Domäne

α -Kette

24/31#1 V α 8	C A A TGTGCAGCA	R A M N R D D K <u>AGGGCCATGAACAGAGATGACAAG</u>	I I F ATCATCTTT	J α 30
24/31#4 V α 8	C A A TGTGCAGCA	R A M N R D D K <u>AGGGCCATGAACAGAGATGACAAG</u>	I I F ATCATCTTT	J α 30
24/31#7 V α 8	C A A TGTGCAGCA	R A M N R D D K <u>AGGGCCATGAACAGAGATGACAAG</u>	I I F ATCATCTTT	J α 30
24/31#9 V α 8	C A A TGTGCAGCA	R A M N R D D K <u>AGGGCCATGAACAGAGATGACAAG</u>	I I F ATCATCTTT	J α 30

β -Kette

24/31#1 V β 5	C X S TGXCXCCAGC	S L D A S G S Y N E <u>AGCTTGGATGCGAGCGGGAGCTACAATGAG</u>	Q F F CAGTTCTTC	J β 2.1
24/31#4 V β 5	C X S TGXCXCCAGC	S L D A S G S Y N E <u>AGCTTGGATGCGAGCGGGAGCTACAATGAG</u>	Q F F CAGTTCTTC	J β 2.1
24/31#7 V β 5	C X S TGXCXCCAGC	S L D A S G S Y N E <u>AGCTTGGATGCGAGCGGGAGCTACAATGAG</u>	Q F F CAGTTCTTC	J β 2.1
24/31#9 V β 5	C X S TGXCXCCAGC	S L D A S G S Y N E <u>AGCTTGGATGCGAGCGGGAGCTACAATGAG</u>	Q F F CAGTTCTTC	J β 2.1

Abbildung D.4.4.a: Darstellung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der CDR3-Domänen, der von den T-Zellklonen des Patienten 24 exprimierten TCR-V α - und V β -Ketten.

Die CDR3-Domänen der TCR α - und β -Ketten der Linien des Patienten 6 waren zwar heterogen untereinander, glichen sich jedoch innerhalb einer V-Gensegmentfamilie in der AS-Sequenz. Die Länge der CDR3-Schleifen lag im Rahmen von sechs bis zehn AS, wobei eine Länge von acht AS dominierte; bei den β -Ketten variierte sie von β - zu β -Kette. Auch die an die jeweiligen V-Familien rearrangierten J-Gensegmente waren für die einzelnen V α - und V β -Segmente verschieden.

D. Ergebnisse

TCL	variable Domäne	CDR3 LOOP	joining Domäne
α-Kette			
6/4	Vα8	C A A TGTGCAGCA	S M G D Y K <u>AGTATGGGCGACTAGAAG</u> L S F Jα20 CTCAGCTTT
6/7	Vα8	C A A TGTGCAGCA	S M G D Y K <u>AGTATGGGCGACTAGAAG</u> L S F Jα20 CTCAGCTTT
6/9	Vα8	C A A TGTGCAGCA	S M G D Y K <u>AGTATGGGCGACTACAAG</u> L S F Jα20 CTCAGCTTT
6/10#2	Vα8	C A A TGTGCAGCA	S M G D Y K <u>AGTATGGGCGACTACAAT</u> L S F Jα20 CTCAGCTTT
6/7	Vα16	C A V TGTGCTGTG	R D M G N T P <u>AGAGACATGGGAAACACACCT</u> L V F Jα29 CTTGCTTTT
6/4	Vα1	C A V TGTGCTGTG	G F S G G Y N K <u>GGGTTTTCTGGTGGCTACAATAAG</u> L I F Jα4 CTGATTTTT
6/8	Vα1	C A V TGTGCTGTG	G F S G G Y N K <u>GGGTTTTCTGGTGGCTACAATAAG</u> L I F Jα4 CTGATTTTT
6/4	vα17	C A A TGTGCAGCA	S Y G G T A S K <u>AGCTACGGCGGCACTGCCAGTAAA</u> L T F Jα44 CTCACCTTT
6/8	vα17	C A A TGTGCAGCA	S Y G G T A S K <u>AGCTACGGCGGCACTGCCAGTAAA</u> L T F Jα44 CTCACCTTT
6/10	vα17	C A A TGTGCAGCA	S Y G G T A S K <u>AGCTACGGCGGCACTGCCAGTAAA</u> L T F Jα44 CTCACCTTT
6/10#	vα17	C A A TGTGCAGCA	S Y G G T A S K <u>AGCTACGGCGGCACTGCCAGTAAA</u> L T F Jα44 CTCACCTTT
6/10#2	vα17	C A A TGTGCAGCA	S Y G G T A S K <u>AGCTACGGCGGCACTGCCAGTAAA</u> L T F Jα44 CTCACCTTT
6/7	Vα17	C A A TGTGCAGCA	S S R S N D Y K <u>AGCTCTCGTTCTAACGACTACAAG</u> L S F Jα20 CTCAGCTTT
6/7	Vα22	C A L TGTGCTCTG	S E I A R F N K <u>AGTGAGATTGCTCGCTTCAACAAA</u> F Y F Jα21 TTTTACTTT
6/8	Vα22	C A L TGTGCTCTG	S E I A R F N K <u>AGTGAGATTGCTCGCTTCAACAAA</u> F Y F Jα21 TTTTACTTT
6/9	Vα22	C A L TGTGCTCTG	S E I A R F N K <u>AGTGAGATTGCTCGCTTCAACAAA</u> F Y F Jα21 TTTTACTTT
6/4	Vα24	C V TGTGTG	V S A G G N N R <u>GTGAGCGCAGGAGGAACAACAGA</u> L A F Jα7 CTCGCTTTT
6/10#2vα15	C A TGTGCC	P F L G N Y G Q N <u>CCCTTTTTGGGTA</u> ACTATGGTCAGAAT F V F Jα26 TTTGCTTTT	
6/7	Vα1	C A V TGTGCTGTG	G R F N S G G G A D G GGTCGATTAAATTCAGGAGGAGGTGCTGACGGA L T F Jα45 CTCACCTTT

D. Ergebnisse

TCL variable Domäne β-Kette		CDR3 LOOP	joining Domäne		
6/4	Vβ2	C S A TGCAGTGCT	S L P G N I <u>AGTCTCCCGGGAAACATT</u>	Q Y F CAGTACTTC	Jβ 2.4
6/10#2	Vβ2	C S A TGCAGTGCT	S L P G N I <u>AGTCTCCCGGGAAACATT</u>	Q Y F CAGTACTTC	Jβ 2.4
6/10	Vβ2	C S A TGCAGTGCT	A F L G G E T <u>GCCTTTCTAGGGGGGAGACC</u>	Q Y F CAGTACTTC	Jβ 2.5
6/7	Vβ13	C A S GAAAACTG	S Y S G L L G E K <u>TTTTTTTGTGCCAGCAGTTACTCCGGA</u>	L F F CTTCTGGGG	Jβ 1.4
6/4	Vβ13.2	C A S TGTGAAAGC	S Y D A G F R T E <u>AGTTACGACGCAGGGTTTCGCACTGAA</u>	A F F GCTTTCTTT	Jβ 1.1
6/8	Vβ13.2	C A S TGTGCCAGC	S Y D A G F R T E <u>AGTTACGACGCAGGGTTTCGCACTGAA</u>	A F F GCTTTCTTT	Jβ 1.1
6/10	Vβ13.2	C A S TGTGCCAGC	S Y D A G F R T E <u>AGTTACGACGCAGGGTTTCGCACTGAA</u>	A F F GCTTTCTTT	Jβ 1.1
6/10#2	Vβ13	C A S TGTGCCAGC	T P S G S G K T H <u>ACCCTAGCGGGAGTGAAAGACCCAG</u>	Y F TACTTC	Jβ 2.5
6/9	Vβ7	C A S TGCGCCAGC	S Q G L G Q A G S Y E <u>AGCCAAGGCTTGGGACAGGCCGGCTCCTACGAG</u>	Q Y F CAGTACTTC	Jβ 2.5

Abbildung D.4.4.b: Darstellung der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der CDR3-Domänen der von den T-Zelllinien des Patienten 6 exprimierte TCR-Vα- und Vβ-Ketten.

Die Vα8-Kette unterschied sich zu der Vα8-Kette, die von den TCC des Patienten 24 exprimiert wurde, in der CDR3-Länge und Aminosäuresequenz. Und auch die CDR3-Domäne der Vβ2-Ketten unterschieden sich in Länge und AS-Sequenz bei den Linien des Patienten 6 von den Klonen des Patienten 40. Diese Unterschiede in den CDR3-Domänen der TCR gleicher V-Familien ist mit der unterschiedlichen Erkennung verschiedener GAD-Epitope der TCL und TCC der jeweiligen Patienten assoziiert.

Die TCR, die bei den einzelnen Diabetespatienten mit der Antigenerkennung assoziiert sind, unterscheiden sich somit von Patient zu Patient, was mit der Präsentation verschiedener GAD-Epitope durch verschiedene Restriktionselemente zusammenhängt.

D.5. Molekulare Interaktion bei der Antigenerkennung GAD-reaktiver T-Lymphozyten des Patienten 40

Die GAD-spezifischen T-Helfer-Zellen des Patienten 40 erkennen das antigene GAD-Epitop p563-575, das vom Restriktionselement HLA-DR53 präsentiert wird, durch einen T-Zellrezeptor, der $V\alpha 2$, bzw. $V\alpha 21$ und $V\beta 2$ trägt.

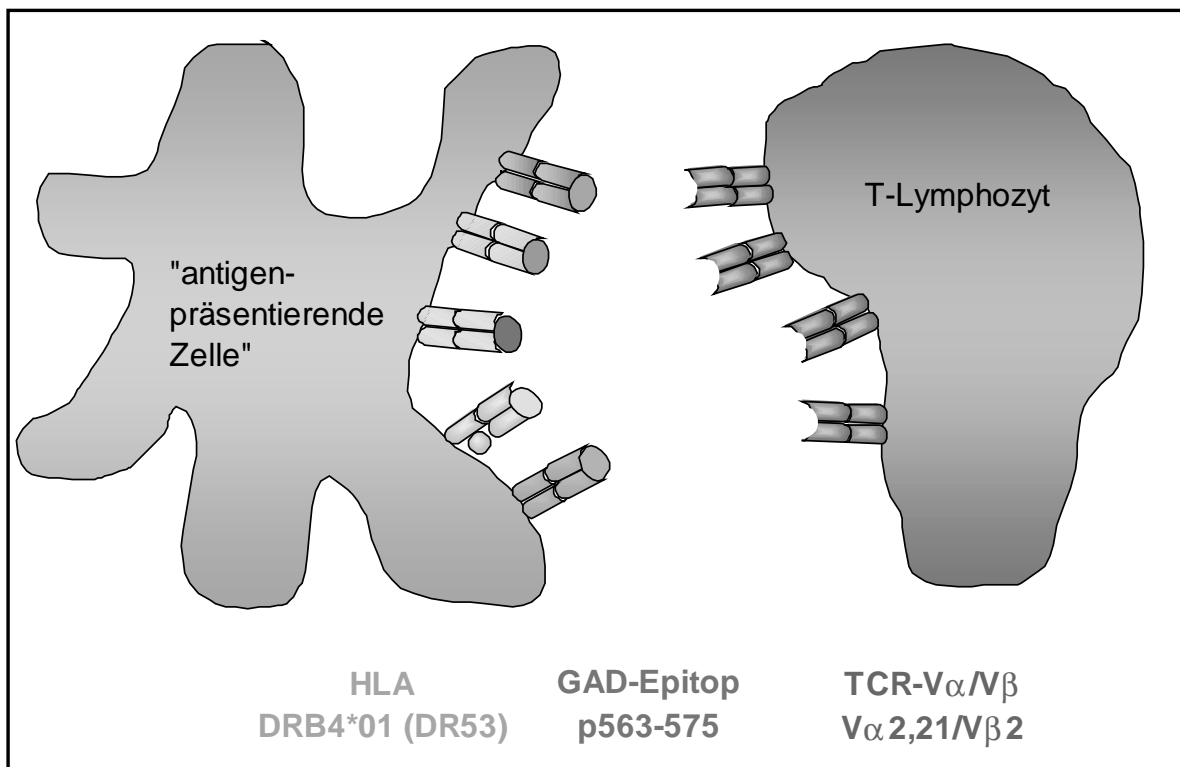


Abbildung: Darstellung der HLA-Antigen Erkennung durch den TCR der GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40, der das GAD-Epitop p563-575 in Restriktion mit dem HLA-DR53-Molekül erkennt. Dieser TCR besteht aus dem Heterodimer der $V\beta 2$ -Kette assoziiert mit $V\alpha 2$, bzw. $V\alpha 21$.

E. Diskussion

E.1. GAD-spezifische T-Lymphozyten beim insulin-abhängigen Diabetes

Die Beteiligung autoreaktiver T-Zellen bei der β -Zellzerstörung, die zur Indikation des insulinabhängigen Diabetes führt, ist schon seit langem bekannt (Atkinson et al., 1992). Analysen der molekularen Mechanismen, die zur Stimulation dieser Zellen führen, sind eine elementare Voraussetzung zur rechtzeitigen Diagnose und Prävention dieser Autoimmunkrankheit.

Bei der Erkennung durch das Immunsystem spielen mehrere inselzellspezifische Antigene eine Rolle. Eines der wichtigsten stellt die Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) dar. So kann im peripheren Blut von neu-diagnostizierten Diabetikern neben GAD-spezifischen Autoantikörpern (Bottazzo et al., 1974, Baekkeskov et al., 1990) eine zelluläre Immunantwort gegen dieses Antigen detektiert werden (Atkinson et al., 1992). Diese durch spezifische Lymphozyten verursachte Reaktion ist jedoch nur auf einen begrenzten Zeitraum beschränkt. Dieser erstreckt sich auf die prädiabetische Phase bis hin zur Manifestation des Krankheitsausbruchs, kann jedoch bereits wenige Wochen nach Diagnose und Insulingabe nicht mehr detektiert werden. Eine elementare Voraussetzung GAD-spezifische T-Lymphozyten etablieren zu können war es daher, Vollblut von neu-diagnostizierten Diabetespatienten zur Verfügung zu haben. Dies war durch die Kooperation mit Dr. Annette Ziegler vom Diabeteszentrum des Schwabinger Krankenhauses ermöglicht. Allerdings konnten nur solche Patienten in dieses Projekt mit einbezogen werden, die zum Zeitpunkt der Diagnose bereits älter waren, da es ethisch nicht zu vertreten gewesen wäre, Kindern, die für diese Studien ausreichende Mengen Blut (ca. 200 ml) abzunehmen.

Die Etablierung GAD-spezifischer T-Zelllinien und -klone erwies sich als ziemlich material- und zeitaufwendig. Nur wenigen Arbeitsgruppen war es zuvor möglich, GAD-reaktive T-Zellen zu kultivieren. Und auch wir waren nicht in der Lage von allen uns zur Verfügung stehendem Patientenmaterial T-Zellklone

zu etablieren. Dies mag zum einen an der Reaktivität der Lymphozyten selbst liegen, zum anderen jedoch auch an der Qualität des GAD-Präparats. Dennoch gelang es uns mit viel Mühe und aufwendiger Pipettierarbeit GAD-spezifische T-Zelllinien und -klone von drei neu-diagnostizierten Diabetespatienten zu etablieren. Die hierbei angewandte sog. Split-Well Technik wurde bereits bei der Etablierung autoreaktiver T-Zelllinien aus Multiple Sklerose Patienten erfolgreich eingesetzt (Pette et al., 1990). Diese Methode erlaubt es, mehrere unabhängige T-Zelllinien aus den peripheren Blutlymphozyten zu isolieren.

E.1.1. GAD-Spezifität der etablierten T-Zelllinien und -klone

Die Charakterisierung der durch die T-Zellen erkannten GAD-Epitope erfolgte mit Hilfe einer Reihe überlappender Peptide, die die gesamte humane GAD-Sequenz abdeckten. Diese Methode lieferte gleichzeitig den Beweis für die Spezifität der T-Zellen gegen GAD. Nur die Linien, die gegen die rekombinante GAD gerichtet waren, reagierten mit mindestens einem der GAD-Peptiden. Linien, die durch Verunreinigungen des Präparats stimuliert worden waren und zunächst als falsch positiv eingeordnet wurden, konnten somit als GAD-unspezifisch entlarvt werden. Die Reinheit der GAD war daher eine grundlegende Voraussetzung zur Etablierung spezifischer Linien. Dieses Problem zeigte sich jedoch erst, nachdem Linien mehrerer Patienten ausreichend expandiert werden konnten, um sie im Proliferationstest mit den Peptidpools zu testen. Teilweise reagierte keine Linie eines Patienten mit einem GAD-Peptid, d.h. die Reaktivität war gegen ein verunreinigendes Nebenprodukt des Präparats gerichtet. Dieses Problem konnte endlich durch den Einsatz eines GAD-Präparats gelöst werden das von einer zweiten Quelle bezogen wurde und eine größere Reinheit bot. Das zuerst verwendete Präparat wurde aus E. coli gewonnen und beinhaltete vermutlich noch bakterielle Verunreinigungen. Die neue GAD wurde im Bakulovirussystem exprimiert und anschließend über affinitätschromatographische Säulen aufgereinigt. Außerdem liegt der Vorteil eines eukaryontischen Expressionssystems darin, daß die GAD Moleküle durch entsprechende Chaperone in ihre

physiologische Form gefaltet werden. Dies könnte die Prozessierung der GAD beeinflussen und daher eine Voraussetzung für die Präsentation des natürlichen Epitops darstellen.

E.2. Epitoperkennung

E.2.1. Peptidvakzinierung

Die Grundidee, die zur Anfertigung dieser Arbeit Anlaß gab, war die Detektion eines gemeinsamen Parameters bei der Reaktivität von T-Lymphozyten gegen GAD in verschiedenen Patienten. Eine Gemeinsamkeit könnte entweder die Erkennung eines identischen Peptid-MHC-Komplexes sein und/oder der Gebrauch eines TCR mit gleichen Elementen. Die Behandlung prädiabetischer Individuen mit einer sog. Peptidvakzine könnte die Selbsttoleranz gegen GAD induzieren und somit die Immunantwort gegen die β -Zellen verhindern. Eine solche Toleranzinduktion konnte bereits im Tiermodell nachgewiesen werden. Im Nonobese (NOD) Mausstamm entwickeln die Tiere spontan Diabetes (Kaufmann et al., 1993, Tisch et al., 1993). Eine orale oder nasale Applikation dieser Tiere mit GAD-Peptiden, führt zur Toleranz der spezifischen T-Zellen und somit zur Senkung der Krankheitsrate (Tian et al., 1996). Eine Erklärung dieses Sachverhalts liegt in der Hypothese, daß eine inselzellspezifische autoaggressive T-Helfer 1 (Th1) dominierende Zellantwort in eine Th2 dominierende Zellantwort umgewandelt wird. Th1- und Th2-Zellen sekretieren ein unterschiedliches und kreuzregulierendes Zytokinprofil. Th1-Zellen fördern durch die Sekretion von $\text{INF-}\gamma$ die zelluläre Immunabwehr und dadurch den Schutz vor intrazellulären Pathogenen. Th2-Zellen favorisieren durch die Sekretion der Interleukine IL-4, IL-5 und IL-6 die humorale, B-zellvermittelte Antikörperantwort, die gegen extrazelluläre Antigene, wie z.B. Parasiten, schützt. Th1 und Th2 regulieren sich gegenseitig, indem die Zytokine des einen T-Zelltyps die Stimulation des anderen inhibieren. So wird durch die Umwandlung einer Th1-dominierten Effektorzellantwort in eine Th2-

dominierte, die inflammatorische Antwort bei Diabetes unterdrückt. Das pathogene Potential der T-Zellen geht dadurch verloren.

Auch im humanen System wird bereits eine Vakzinierung mit immunstimulatorischen Selbstpeptiden angewandt. Die gegen das "Myelin Basic Protein" (MBP) gerichtete Immunantwort, die zur Ausbildung von Multipler Sklerose führt, kann durch die Gabe von MBP-Peptiden moduliert werden. Dabei wird die Zerstörung der Myelinscheiden im Zentralen Nervensystem inhibiert (Weiner et al., 1993). Problematisch ist jedoch, daß das erkannte MBP-Epitop bei den einzelnen MS-Patienten variiert, bzw., daß sogar während des Krankheitsverlaufs eines Patienten ein "Epitopspreading" gefolgt von einer Rekrutierung von T-Zellen mit Spezifität für andere Peptide stattfindet. Es werden in Verlauf der Krankheit in verschiedenen Zeiträumen unterschiedliche MBP-Epitope von verschiedenen T-Zellen erkannt. D.h. trotz der Toleranz gegen ein Epitop entwickelt das Immunsystem T-Zellen gegen weitere Epitope.

E.2.2. Erkennung unterschiedlicher GAD-Epitope bei verschiedenen Patienten

Während des Verlaufs dieser Studien wurde klar, daß die T-Zellen verschiedener Patienten gegen verschiedene GAD-Peptide reagierten. So erkennen die T-Zellen des Patienten 40 die Peptidsequenz p563-575, die im carboxyterminalen Bereich der GAD lokalisiert ist. Diese unterscheidet sich jedoch von den Sequenzen, die von den T-Zelllinien- und -klonen der Patienten 6 bzw. 24 erkannt werden. Auch die durch eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Peter van Endert am Hospital Necker in Paris erhaltenen Informationen, sowie aus Veröffentlichungen erhaltenen Daten (Atkinson et al., 1994; Panina-Bordignon et al., 1995) bestätigen den Sachverhalt der unterschiedlichen Epitoperkennung der verschiedenen Patienten.

In Abbildung E.2.2.a ist die gesamte humane GAD-Sequenz

E. Diskussion

dargestellt und die jeweiligen Epitope, welche von den T-Zellen der verschiedenen Patienten erkannt werden, markiert.

Das von den Linien des Patienten 6 erkannte Epitop liegt im mittleren Bereich der GAD. Es umfaßt den Sequenzabschnitt p270-283 und wird durch HLA-DRB1*0401-kodierte Moleküle präsentiert. Daß es sich hier um ein natürlich prozessiertes GAD-T-Zellepitop handelt, wird im Tiermodell bestätigt. DRB1*0401-transgene Mäuse zeigen eine spezifische T-Zellantwort gegen das hier detektierte Epitop (Wicker et al., 1996).

E. Diskussion

1	MASPGSGFWSFGSE DGSGDSENPGTARAWXQVAQKFTGGIGNKLXALLYG	50
51	DAEKPAESGGSQPPRAAARKAACACDQKPCSCSKVDVNYA DRB1*0101 FLHATDLLPA	100
101	CDGERPTIAFLQDVMNILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNELLQEYNWELA	150
151	DQPONLEEILMHCQTTLK DRB1*1501 YAERTGHPRYFNQLSTGLDMVGLAADWLTSTA DRB1*1601 DRB1*1501	200
201	NTNMRTYEIAPVFVLLFYVTLK DRB1*1501 KMREIIGWPGSGDGIFSPGGAI SNMYA	250
251	MMIARFKMFPEVKEKGMAALPRLIAFTSEHSHF DRB1*1501 DRB1*0401 SLKKGAAALGIGTDSVI	300
301	LIKCDERGMIPSDLERRILEAKQKGFVPFLVSATAGTTVYGAFDPLLAV	350
351	ADICKKYKIWMHVDAAWGGGLLSRKHKWKLSGVERANSVTWNPHKMMGV	400
401	PLQCSALLVREEGLMQNCNQMHASYLFQQDKHYDLSYDTGDKALQCGRHV	450
451	DVFKLWLMWRAKTTGFEAHVDKCLELAEYLYNI IKNREGYEMVFDGKPQ	500
501	HTNVCFWYIPPSLRTLEDNEERMSRLSKVAPVIKARMMEYGTTMVSQPL	550
551	GDKVNFFRMVISNPAATHQDIDFLIEEIERLGQDL DRB4*01	585

Abbildung E.2.2.a: GAD-Epitope, die von den verschiedenen Diabetespatienten erkannt werden. Über den grünmarkierten Aminosäuresequenzen sind die jeweiligen Restriktionselemente angegeben. Die zum Coxsackie-Virus homologe Sequenz ist rot markiert.

E.2.3. Kreuzreaktion GAD-spezifischer T-Lymphozyten mit viralem Coxsackiepeptid?

In direkter Nachbarschaft zum GAD-Epitop, das von den TCL des Patienten 6 erkannt wird ist eine Sequenz lokalisiert, die Homologie zu der Peptidsequenz des P2-C Proteins des Coxsackie Virus aufweist (Abb. E2.2.a: rot markierte Sequenz). Auch eine im Labor von van Endert etablierte T-Zelllinie erkennt eine GAD-Sequenz, die an diese virushomologe Peptidsequenz anschließt. Es gibt Spekulationen darüber, daß die zelluläre Immunantwort gegen dieses virale Protein durch ein molekulares Mimikry eine Reaktion gegen Selbst induziert, was letztendlich zum Ausbruch von Diabetes führt (Kaufman et al., 1993). Andere Arbeitsgruppen konnten sogar eine T-Zellantwort gegen das 20mer Peptid p260-279, das die P2-C-homologe Sequenz PEVKEK einschließt, detektieren (Atkinson et al., 1994).

Die Beteiligung einer Coxsackievirus Infektion bei der Induktion von Diabetes durch "molekulare Mimikry" kann nicht ausgeschlossen werden, da es mehrere Hinweise für eine Kreuzreaktion von T-Zellen mit viralen Proteinen gibt. Dennoch gibt es mehrere Beispiele dafür, daß GAD-spezifische T-Zellen gegen andere Epitope gerichtet sind. So reagieren auch die aus Patient 6 etablierten Linien spezifisch gegen eine Peptidsequenz, die nicht mit der viralen Peptidsequenz überlappen.

E.2.4. Erkennung mehrerer Epitope durch eine T-Zelllinie

Auch eine Linie, die aus dem peripheren Blut vom Patienten 24 isoliert worden war, erkennt andere Abschnitte der GAD. Es werden sogar mehrere Epitope erkannt, die von verschiedenen Klasse-II-Molekülen, die von verschiedenen HLA-Allelen kodiert sind, präsentiert werden. Durch Reklonierung dieser TCL wurden unabhängig voneinander fünf Einzelklone etabliert, die alle das selbe GAD-Epitop erkennen. Diese TCC zeigen auch eine identische TCR-Expression (V α 8/V β 5).

Da alle fünf aus dieser Linie isolierten Klone identisch sind und keine TCC etabliert werden konnten, die gegen eines der anderen GAD-Epitope reagieren, könnte man vermuten, daß es sich bei diesen Klonen um die dominanten GAD-spezifischen T-Zellen bei diesem Patienten handelt.

Die T-Zelllinie erkennt die GAD-Peptide in Restriktion mit den zwei verschiedenen HLA-kodierten Molekülen, HLA-DRB1*1501 und –DRB1*1601. Das DRB1*1501-kodierte Molekül scheint sogar mehrere sequenzunabhängige Peptide zu präsentieren. Die Präsentation verschiedener Selbstpeptide durch ein und dasselbe HLA-Molekül, das vom gleichen Allel kodiert wird, konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen detektiert werden (Falk et al., 1991, Rudensky et al., 1991 und Marack et al., 1993). So scheint die Erkennung mehrerer GAD-Epitope und die Präsentation verschiedener GAD-Peptide durch das selbe HLA-Molekül in einem Patienten nicht ungewöhnlich zu sein.

E.3. HLA-Restriktion

Für die Diabetessuszeptibilität ist vor allem die Expression verschiedener HLA-Allele von Bedeutung. Dabei spielen in erster Linie die DRB1- und DQB1-Loci eine Rolle. Individuen, die DR3 (DRB1*03) oder DR4 (DRB1*04) exprimieren, tragen ein erhöhtes Risiko, vor allem dann, wenn in der nahen Verwandtschaft bereits eine Diabeteserkrankung vorliegt. Die stärkste Assoziation wird jedoch durch die Position 57 der DQ β -Kette determiniert. Eine Asparaginsäure an dieser Position wirkt protektiv, wohingegen ein neutraler Aminosäurerest, wie Alanin, Serin oder Valin, das Risiko für Diabetes erhöht. Zu Beginn dieser Studie wurde spekuliert, daß autoreaktive T-Zellen DQ-restringiert sind. Interessanterweise konnten nur DR-restringierte Linien etabliert werden. Möglicherweise ist speziell die GAD-Präsentation mit DR-Molekülen assoziiert. Bei der Immunantwort gegen die β -Zellen spielen noch weitere inselzellspezifische Antigene eine Rolle, wie z.B. IA-2, Insulin, Carboxypeptidase H oder auch Hitzeschockproteine. Die Präsentation der

Epitope dieser Antigene könnte mit der Expression von DQ-Allelen zusammenhängen. Denkbar wäre auch, daß die direkte Epitopräsentation durch DR erfolgt, die DQ-Allel-kodierten Moleküle jedoch eine regulatorische Funktion besitzen, z.B. in der Weise, daß sie Antigene von anderen T-Zellen, z.B. deren TCR, tragen und dadurch regulatorisch in die Interaktion der Effektorzellen mit den zu zerstörenden β -Zellen, eingreifen. Ein Zusammenwirken mehrerer T-Zellen verschiedener Spezifität kann auch deshalb prognostiziert werden, da die Expression nur eines Suszeptibilitätsallels zur Krankheitsausbildung allein nicht ausreicht. Das Risiko z.B. durch DR4 wird durch die parallele Expression bestimmter DQ-Allele moduliert (Todd et al.,1987). So ist für eine volle Suszeptibilität das Vorhandensein von DRB1*0401 zusammen mit DQB1*0302 erforderlich, was bei den Patienten 6 und 40 der Fall ist.

Das Dogma eines erhöhten Diabetesrisikos durch DR3 und DR4 muß jedoch anhand unserer Daten relativiert werden, da bei zwei der vier hier und im Labor von van Endert analysierten Patienten das GAD-Peptid DR2-restringiert erkannt wird. Vor allem das bisher als protektiv eingestufte DRB1*1501-Allel ist in die Präsentation der GAD für die autoreaktiven T-Zellen involviert.

E.3.1. Epitoperkennung bei Patient 40 erfolgt HLA-DRB4*01 (DR53)-restringiert

Ein noch überraschenderes Ergebnis lieferte das im Rahmen dieser Arbeit analysierte Restriktionselement der GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40. Zunächst wurde erwartet, daß die Antigenerkennung des DR4-homozygoten Patienten DRB1*0401-assoziiert erfolgt. Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch, daß auch PBL, die andere DR4-Subklassen exprimierten, in der Lage waren, die T-Zellen zu stimulieren. Sogar DR7-positive PBL zeigten ein spezifisches stimulatorisches Potential. Es erschien daher fraglich, daß

E. Diskussion

das DRB1*0401-kodierte Molekül direkt in die Antigenpräsentation involviert ist.

Neben den kodierten DRB1-Kettengenen werden noch weitere β -Ketten exprimiert, die mit der α -Kette ein funktionsfähiges HLA-DR-Heterodimer bilden. Die Expression dieser zweiten β -Kette erfolgt hoch restringiert mit einem bestimmten B1-Subtyp. So wird neben den durch B1-Allel-kodierten Molekülen DR4, DR7 und DR9 eine zweite β -Kette, die B4-Kette exprimiert. Dieses HLA-DRB4- $\alpha\beta$ -Heterodimer wird synonym auch DR53 genannt. Es kann in mehrere Subklassen eingeteilt werden, die sich untereinander durch einzelne Aminosäureaustausche unterscheiden. Die durch DR53-Allele DRB4*0101, *0102 und *0103 kodierten Moleküle können auf der Zelloberfläche detektiert werden, wohingegen *01011 ein Nullallel darstellt das keine Moleküle auf der Oberfläche exprimiert.

Die Vermutung lag daher nahe, daß es sich bei dem GAD-präsentierenden Element nicht um die B1-, sondern um die B4-Kette des $\alpha\beta$ -Heterodimers handelt. Inhibitionsstudien mit DR53-spezifischen Antikörpern und Stimulationstests mit DR53-transfizierten Mausfibroblastenlinien konnten diesen Verdacht bestätigen. Das Epitop p563-575 wird von den GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 HLA-DR53-restringiert erkannt.

Die Involvierung, der zu den serologisch definierten B1-Ketten parallel exprimierten B4-Ketten, wurde bereits bei anderen Autoimmunkrankheiten beobachtet. Bei der primären biliären Zirrhose wird von den autoreaktiven T-Zellen ein Epitop des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes (PDC)-E2 erkannt, welches von HLA-DRB4*0101 (DR53) –kodierten Molekülen präsentiert wird (Shimoda et al.,1995).

Das von dieser Arbeitsgruppe definierte Bindungsmotif EXDK paßt nicht zu dem in meiner Arbeit detektierten essentiellen Aminosäuren für HLA-Bindung, bzw. T-Zellrezeptorerkennung. Auch in Studien, die unabhängig von einer T-Zellerkennung, die Bindung spezifischer Peptide an HLA-DR53 testeten, konnte keine Kompatibilität mit dem hier detektierten GAD-Epitop festgestellt werden.

E. Diskussion

Peptid	Sequenz	Literatur
Pyruvat Dehydrogenase Komplex-E2	GDLLAEI <u>ETDK</u> ATI	Shimoda et al., 1995
L Plastin	NNAKYAISM <u>ARK</u> IGA	Kobayashi et al., 1996
Glutaminsäure Decarboxylase	NPAATHQDIDFLI	eigene Resultate

Tabelle E.3.1.a: Darstellung, der aus der Literatur bekannten DR53-Peptide im Vergleich zur GAD-Sequenz. Unterstrichen ist das von Shimoda et al. definierte Bindungsmotif.

Es ist bereits aus der Literatur bekannt, daß MHC-Klasse-II-Peptide nicht so restringiert in ihrem Peptidbindungsverhalten sind, wie das bei den Molekülen der MHC-Klasse-I der Fall ist. Bei den MHC-Klasse-I-Molekülen genügt der Austausch einer einzigen Aminosäure an einer definierten Position des Peptids, um die Bindung vollständig zu verhindern. Bei MHC-Klasse-II-Molekülen kann zwar ebenfalls ein für die jeweiligen Allele spezifisches Bindungsmotif definiert werden, dies ist jedoch weniger restringiert, d.h. die Toleranz gegenüber Aminosäureaustausche an den Ankerpositionen ist z.T. relativ hoch, was bereits an anderer Stelle dieses Projekts beobachtet werden konnte. Die HLA-DRB1*1501-kodierten Moleküle des Patienten 24 können mehrere GAD-Peptide präsentieren, die in ihrer Aminosäuresequenz stark variieren.

Die verschiedenen, bisher beschriebenen DR53-Peptidliganden sind in Tabelle E.3.1.a aufgelistet.

E.4. Erkennung des HLA-Peptid Komplexes durch den T-Zellrezeptor

Die molekularen Interaktionen zwischen dem HLA-Antigen Komplex und dem spezifischen T-Zellrezeptor sind in der Regel sehr restringiert. Diese Spezifität wird durch das Rearrangement einzelner variabler Gensegmente der TCR- α und - β Kette an die jeweilige Konstantregion gewährleistet. Durch die Definition der von einem TCR exprimierten TCR-V α und -V β Gensegmentfamilien können die T-Zellen einer bestimmten Spezifität zugeordnet werden. Außerdem wird die Spezifität durch die hypervariable CDR3-Region erhöht, die durch N-Nukleotidsubstitution in der Grenzregion zwischen dem variablen und dem konstanten Genabschnitt gebildet wird.

Die Analyse der TCR der GAD-spezifischen T-Zellen könnte ein Instrument zur Detektion dieser T-Zellen im Blut von prädiabetischen Personen darstellen. Die gesamten, im Labor von Dr. Endl etablierten T-Zelllinien und -klone der drei Diabetespatienten wurden im Rahmen dieser Arbeit auf TCR-Ebene charakterisiert. Es wurde darauf spekuliert, daß die GAD-reaktiven T-Zellen aller Diabetespatienten ein einheitlich eingeschränktes TCR-Repertoire aufweisen. Diese Erwartung konnte nicht bestätigt werden. Zwar sind die TCR der Klone eines Patienten identisch, sie unterscheiden sich jedoch im Repertoire der exprimierten V α - und V β -Familien zwischen den einzelnen Patienten. Auch die CDR3-Regionen variieren in ihrer Länge und Aminosäuresequenz. Der Gebrauch unterschiedlicher TCR korreliert jedoch damit, daß die autoreaktiven T-Zellen verschiedene GAD-Peptide, die von verschiedenen HLA-Allel-kodierten Molekülen präsentiert werden, erkennen.

E.4.1. Detektion von zwei α -Ketten bei GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40

Interessanterweise konnten bei allen Klonen des Patienten 40 neben

E. Diskussion

einer V β -Kette (V β 2) zwei V α -Ketten detektiert werden, nämlich V α 2 und V α 21. Oberflächenanalysen mit einem V α 2-spezifischen monoklonalen Antikörper konnten keine eindeutige Klärung darüber liefern, ob es sich bei den als Klonen definierten T-Zellen um zwei verschiedene T-Zelltypen handelt oder tatsächlich um einen T-Zellklon, der zwei verschiedene TCR auf der Oberfläche exprimiert. Die T-Zellen konnten auch mit Hilfe einer V α 2-mAk-gekoppelten Beadseparation nicht getrennt werden (Daten nicht gezeigt). Handelte es sich um zwei verschiedene Zelltypen, ist zu vermuten, daß der eine Zelltyp direkt für die GAD-Erkennung verantwortlich ist, während der andere eine regulatorische Funktion übernimmt. Wenn das Proliferationspotential des GAD-spezifischen T-Zelltyps tatsächlich von der stimulatorischen Anwesenheit des zweiten T-Zelltyps abhängt, könnte man sich vorstellen, daß beide nur gemeinsam expandiert werden können. Selbst nach Reklonierung dieser fünf unabhängig voneinander etablierten T-Zellklone waren immer die beiden V α -Ketten vorhanden. Die zweite Möglichkeit wäre die Expression zweier verschiedener TCR auf einer T-Zelle. Diese beiden TCR setzten sich aus einem Heterodimer der V β 2-Kette, jeweils gepaart mit V α 2, bzw. V α 21, zusammen. T-Zellen solcher Art wurden in der Literatur bereits beschrieben (Heath et al., 1993; Hardardottir et al., 1995). Die Expression zweier funktioneller α -Ketten auf der Zelloberfläche resultiert vermutlich aus einer fehlenden allelischen Exklusion.

T-Zellen, die zwei verschiedene TCR exprimieren, könnten gerade bei Selbstimmunität in der Weise eine Rolle spielen, daß der eine TCR gegen ein Fremd- der zweite gegen ein Selbstantigen gerichtet ist. Nach Stimulation der T-Zelle durch Fremdartigenkontakt wäre diese Zelle durch ihren zweiten TCR auch autoreaktiv. Dies wäre, neben der "molekulare Mimikry" Hypothese, auch eine Erklärung dafür, daß Autoimmunerkrankungen durch virale oder bakterielle Infektionen induziert werden.

Hinter der Expression zweier TCR-V α -Ketten könnte sich demzufolge ein interessantes Phänomen der T-Zellregulation bei Diabetes, bzw. Autoimmunerkrankungen im allgemeinen, verbergen. Die Enthüllung dieses Rätsels hat erste Priorität in meinen weiteren Forschungsvorhaben, da es

vielversprechende Erkenntnisse über die Funktion und Wirkungsweise von T-Lymphozyten bieten könnte. Die Etablierung einer TCR-spezifischen Einzelzell-PCR hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt, wird aber im Anschluß an diese in Angriff genommen.

E.5. Pathogenese des insulinabhängigen Diabetes

Die zellulären Abläufe bei der Pathogenese von Diabetes sind noch immer nicht vollständig geklärt. Anhand des NOD-Maus Modells konnten jedoch einige wichtige Parameter definiert werden, deren Zusammenspiel bei der Initiation und dem Verlauf der β -Zellerstörung noch nicht vollständig charakterisiert sind. Bei der Initiation spielen neben dendritischen Zellen (DZ) und Makrophagen vor allem T-Lymphozyten eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß eine Übertragung der CD4⁺-Zellen einer diabetischen NOD-Maus in einen Rezipienten, dieser infolgedessen ebenfalls Diabetes entwickelt (Wicker et al., 1986; Bendelac et al., 1987). Auch die in dieser Arbeit etablierten und charakterisierten GAD-spezifischen Linien und Klone sind vom CD4-positiven T-Zelltyp. Das Zytokinmuster ist vom Th1-Typ, d.h. es werden IFN- γ und TNF- α produziert. Die dadurch vermittelte zelluläre Immunität führt zur β -Zell-Toxizität durch Apoptoseinduktion .

Der Einfluß von TNF- α wird in der Literatur noch kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen sprechen diesem Zytokin eine eher protektive Rolle zu (Jacob et al., 1990; Grewal et al., 1996). Andere konnten dessen erhöhte Produktion in den infiltrierten Langerhans'schen Inseln von diabetischen NOD-Mäusen nachweisen (Dahlén et al., 1998; Müller et al., 1995). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob TNF- α direkt oder indirekt in den Autoimmunprozeß involviert ist.

Das pathogene Potential der T-Helfer Zellen hängt von der Balance zwischen Th1 und Th2 ab. Eine Modulation der zellulären Th1- in eine Th2-Antwort führt zur Protektion der β -Zellen durch einen hämatopoetischen Angriff. Eine solche Modifikation hängt mit den von den T-Zellen erkannten Epitopen zusammen. Die Interaktion des TCR mit dem HLA-Peptid Komplex kann,

E. Diskussion

neben einer Stimulation auch zu einer Veränderung der T-Zellfunktion führen. Dies kann durch einzelne Aminosäureaustausche im Ursprungsepitop ausgelöst werden. Der Einsatz dieser sog. "altered peptid ligands" (APL) führt bei MBP-spezifischen T-Zellen zur Konvertierung der Th1- in eine Th2-Antwort und dadurch zum Schutz vor experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE) im Mausmodell für MS. Durch die Änderung des Zytokinmusters geht das pathogene Potential verloren. Die Auswirkung einzelner Aminosäureaustausche auf die T-Zellantwort konnte auch bei den GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 detektiert werden. Die Stimulation mit den Ala-scan Peptiden zeigte ein unterschiedliches Muster in der Proliferation und der TNF- α Sekretion. Der Austausch einzelner Aminosäuren durch Alanin reicht zwar nicht mehr aus, um die T-Zelle zur Proliferation zu aktivieren, das Peptid kann jedoch durchaus noch von diesen erkannt werden und zu einer Modifikation der Zytokinsekretion führen. Um solche APL gezielt einzusetzen, müssen zunächst die Aminosäuren charakterisiert werden, die für die Bindung des Peptids am HLA-Molekül essentiell sind. Anschließend können die für die TCR-Erkennung wichtigen Aminosäuren so ausgetauscht werden, daß sie zu einer Änderung der T-Zellfunktionen führen. Diese wird durch Sekretion der Zytokine TNF- α , INF- γ und IL-4 im Kulturüberstand detektiert. Der Einsatz dieser APL wäre bei der Diabetesprävention denkbar. Der zur Detektion der Ankerpositionen des p563-575 Peptids am HLA-DRB4*01 (DR53) -kodierte Molekül verwendete Bindungstest lieferte jedoch kein auswertbares Ergebnis. Dies lag zum einen an der nicht einfachen Isolierung des DR53-Moleküls aus dem BLCL-Lysat, welches neben den B4-Ketten überwiegend DRB1-Ketten enthielt. Die Trennung dieser beiden Moleküle aus dem DR-Gemisch durch eine antikörpergekoppelte Protein G-Sepharosesäule erforderte vermutlich zu unphysiologische Bedingungen, so daß DR53 im Western zwar noch nachgewiesen werden konnte, die Konformation dieses Moleküls jedoch vielleicht so verändert war, daß das Peptid nicht mehr gebunden werden konnte. Die nächste Problematik war der Bindungstest selbst. Die Konzentrations- und Pufferbedingungen des für Analysen mit dem HLA-DRB1*0401-kodierten Moleküls gut etablierten Systems sind nicht einfach auf andere HLA-Moleküle übertragbar. Persönliche Mitteilungen der

Arbeitsgruppe von Dr. Melms der Universität Tübingen zeigten, daß Analysen mit verschiedenen HLA-DQ-Allel-kodierten Moleküle unterschiedlich gut in diesem Bindungstest funktionierten. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Peptidbindung an HLA-DR53 mit diesem Test nicht zu analysieren ist. Selbst die Bindung eines aus der Literatur bekannten DR53-spezifischen Epitops (Shimoda et al., 1995) konnte in diesem Test nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Alternativ werden derzeit Studien durchgeführt, die die Bindung des biotinylierten p563-575-Peptids an HLA-DR53-transfizierten Mausfibroblastenlinien direkt an den Zellen durchflußzytometrisch nachweisen.

E.6. Ausblicke

Die molekularen Mechanismen, die beim hematopoetischen Angriff der β -Zellen zur Ausbildung von insulinabhängigem Diabetes führen, scheinen bei jedem Patienten individuell abzulaufen. Selbst die Reaktivität gegen das Autoantigen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) variiert auf molekularer Ebene von Patient zu Patient.

Die in dieser Arbeit analysierte Interaktion der GAD-spezifischen T-Zellen des Patienten 40 mit dem antigenpräsentierenden HLA-Peptidkomplex ist für alle aus diesem Patienten isolierten T-Zellklone identisch. Die fünf Klone exprimieren T-Zellrezeptoren, die $V\beta 2$ gepaart mit einer $V\alpha 2$ - oder $V\alpha 21$ -Kette tragen. Sie erkennen das GAD-Epitop p563-575, das von HLA-DRB4*01 (DR53)-kodierten Molekülen präsentiert wird.

Anhand ihres spezifischen TCR könnten diese Zellen im Blut von Prädiabetikern detektiert und somit das Ausmaß und Fortschreiten des Krankheitsverlaufs verfolgt werden. Ein solches Detektionsverfahren könnte z.B. auf der Grundlage der PCR-Technik basieren, durch Amplifikation der diabetesspezifischen TCR aus den peripheren Blutlymphozyten. Die Detektion der autoreaktiven T-Zellen könnte auch durch spezifische TCR-Liganden erfolgen. Solche spezifischen Liganden sind z.B. MHC-Peptid Tetramere, deren Einsatz bereits in einem transgenen Tiermodell erfolgreich bei der Detektion autoreaktiver T-Zellen gezeigt wurde (Crawford et al., 1998).

E. Diskussion

Auch therapeutisch könnte man sich diese Kenntnis durch spezifische Inhibition über eine Komplexierung der GAD-reaktiven T-Zellen mittels solcher Tetramere oder über den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen die hier detektierten TCR zunutze machen. Monoklonale Antikörper gegen T-Zellen konnten bereits im Tiermodell mit BB-Ratten präventiv gegen Diabetes eingesetzt werden (Like et al., 1979).

Eine weitere Möglichkeit eines Therapieeinsatzes stellt die Immunisierung der prädiabetischen Patienten mit GAD-Peptiden dar. Diese im Mausmodell bereits erfolgreich angewandte Methode zur Toleranzinduktion könnte auch im humanen System eingesetzt werden. Auch der Einsatz der "altered peptid ligands" (APL), der vom Ursprungsepitop abgeleiteten Peptide, die vom TCR noch erkannt werden aber statt mit Proliferation mit einer veränderten Zytokinsekretion reagieren, scheint vielversprechend. Der dadurch induzierte Switch von einer Th1-dominierten in eine Th2-dominierten Antwort führt zur Protektion der β -Zellzerstörung und dadurch zum Schutz vor Diabetes.

Diese molekularen Parameter der GAD-Erkennung variieren jedoch in allen hier analysierten Patienten. Die Varianz umfaßt das GAD-Epitop, das dieses präsentierende Restriktionselement und den TCR, der diesen Komplex erkennt.

Detektionsverfahren für das rechtzeitige Erkennen aktivierter autoreaktiver T-Zellen, noch bevor mehr als 90% der β -Zellen zerstört sind, wäre daher nur durch eine Detektion denkbar, die mehrere GAD-spezifische TCR involviert. Und auch auf therapeutischer Ebene müßten die detektierten GAD-Epitope mehrerer Patienten berücksichtigt werden, was durch den Einsatz eines GAD-Peptidcocktails möglich wäre. Allerdings zeigt die große Variabilität, die durch diese Studien klar geworden ist, wie schwierig die Entwicklung solcher Detektions- und Therapieverfahren sein wird.

F. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A.L.F.	Laser-gestützter, fluoreszenzdetektierender Sequenzierautomat
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATCC	“American Type Culture Collection” (Depot für Antikörper und Zelllinien)
B-LCL	lymphoblastoide (EBV-transformierte) B-Zelllinie
BIS	N, N' Methylenebisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	ungefähr
CD	“cluster of differentiation” (Differenzierungsantigen)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region
μCi	Mikro Curie (1 μCi = 3,7 x 10 ⁴ Bequerel)
cDNA	(zu mRNA) komplementäre DNA
CML	Chromfreisetzungstest
cpm	counts (Ereignisse) pro Minute
⁵¹ Cr	radioaktives Chromisotop
CTL	zytotoxische T-Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Di-Natriummethylenediamintetraacetat
et al.	und andere
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät (Durchflußzytometer)
FBS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
μg	Mikrogramm
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung (1g = 9,81 m/s ²)
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
h	Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
kb	Kilobasenpaare
kD	KiloDalton
Kp	Kontrollspender
μl	Mikroliter
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
M	molar
μM	mikromolar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHC	“Major Histocompatibility Complex”

F. Abkürzungen

NK	Natürliche Killerzelle
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
nM	nanomolar
OD	optische Dichte
PBL	Lymphozyten des peripheren Bluts
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin
pmol	Picomol
RAG	rekombinationsaktivierendes Gen
RPMI	“Rosewell Park Memorial Institute”
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodezylphosphat
SI	Stimulationsindex
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAP	“transporters associated with antigen processing”
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCC	T-Zellklon
TCL	T-Zelllinie
TCR	“T cell receptor” (T-Zellrezeptor)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylenethylendiamin
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNS
U	“Unit” (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	und andere
UT	untranslatierter Bereich
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumenäquivalent
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
w/v	Gewicht pro Gewicht des Gesamtvolumens
w/w	Gewicht pro Gesamtgewicht
z. B.	zum Beispiel

Basen der DNA / RNA

A = Adenin
C = Cytosin
G = Guanin
T = Thymin
U = Uracil

Ein-Buchstaben-Kode der Aminosäuren

Alanin (Ala)	A
Arginin (Arg)	R
Asparagin (Asn)	N
Asparaginsäure (Asp)	D
Cystein (Cys)	C
Glutaminsäure (Glu)	E
Glutamin (Gln)	Q
Glycin (Gly)	G
Histidin (His)	H
Isoleucin (Ile)	I
Leucin (Leu)	L
Lysin (Lys)	K
Methionin (Met)	M
Phenylalanin (Phe)	F
Prolin (Pro)	P
Serin (Ser)	S
Threonin (Thr)	T
Tryptophan (Trp)	W
Tyrosin (Tyr)	Y
Valin (Val)	V

G. Literatur

Acha-Orbea, H., McDevitt, H.O.

The first external domain of the non-obese diabetic mouse class II I-A β chain is unique.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2435-2439, 1987

Atkinson, M.A., Kaufmann, D.L., Campbell, L., Gibbs, K.A., Shah, S.C., Bu, D.F., Erlander, M.G., Tobin, A.J. und McLaren, N.K.

Response of peripheral blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes.

Lancet 339: 458-459, 1992

Atkinson, M.A., Brown, M.A., Campbell, L., Darrow, B.L., Kaufmann, D.L. und McLaren, N.K.

Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and Coxsackie virus in insulin-dependent diabetes.

J. Clin. Invest. 94:2125-2129, 1994

Asrar el, A.M., van den Oord, J.J., Billiau, A., Desmet, V., Emarah, M.H. und Missotten, L.

Recombinant interferon-gamma induces HLA-DR expression on human corneal epithelial and endothelial cells in vitro: a preliminary report

Br. J. Ophthalmol. 73: 587-590, 1989

Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H. und De Camilli, P.

Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.

Nature 347: 151-156, 1990

Balomenos, D., Balderas, R.S., Mulvany, K.P., Kaye, J., Kono, D.H. und Theophilopoulos, A.N.

Incomplete T cell receptor V β allelic exclusion and dual V β -expressing cells

J. Immunol. 155: 3308-3312, 1995

Basham, T.Y. und Merigan, T.C.

Recombinant interferon- γ increases HLA-DR synthesis and expression

J. Immunol. 130: 1492-1494, 1983

Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C. und Bach, J.F.

Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells.

J. Exp. Med 166: 623-832, 1987

G. Literatur

Bjorkmann, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J.L. und Wiley, D.C

Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.

Nature 329: 506-512, 1987a

Bjorkmann, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J.L. und Wiley, D.C

The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.

Nature 329: 512-518, 1987b

Boitard, C., Villa, M.C., Becourt, C., Gia, H.P., Huc, C., Sempe, P., Portier, M.M. und Bach, J.F.

Peripherin: an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 172-176, 1992

Bonifacio, E., Bingley, P.J., Shattock, M. u.a.

Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes.

Lancet 335: 147-149, 1990

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A. und Doniach, D.

Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.

Lancet 2: 1279-1282, 1974

Bottazzo, G.F., Path, M.R.C., Dean, B.M., McNally, J.M., MacKay, E.H., Path, M.R.C., Swift, P.G.F. und Path, R.G.

In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancrea in diabetic insulinitis.

N. Eng. J. Med. 313: 353-360, 1985

Brenner, M.B., Mclean, J., Dialynas, D.P., Strominger, J.L., Smith, J.A, Owen, F.L., Seidman, J.G., Ip, S., Rosen, F. und Krangel, M.S.

Identification of a putative second T cell receptor.

Nature 322: 145-149, 1986

Candeias, S., Waltzinger, C., Benoist, C. und Mathis, D.

The V β 17⁺ T cell repertoire: skewed J β usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4⁺ versus CD8⁺ cells.

J. Exp. Med. 174: 989-1000, 1991

Castano, L., Russo E., Zhou, L., Lipes, M.A. und Eisenbarth, G.S.

Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 73: 1197-1201, 1991

Chervonsky, A.V., Wang, Y., Wong, F.S., Visintin, I., Flavell, R.A., Janeway, C.A. und Matis, L.A.

The role of Fas in autoimmune diabetes.

Cell 89: 17-24, 1997

Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P., Kappler, J.

Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes.

Immunity 8: 675-682, 1998

Dahlén, E., Dawe, K., Ohlsson, L. und Hedlund, G.

Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonbese diabetic mouse.

J. Immunol. 160: 3585-3593, 1998

Davis, M. M.

T cell receptor gene diversity and selection

Annu. Rev. Biochem.59: 475-496, 1990

Davis, M.M. und Bjorkman, P.J.

T cell antigen receptor genes and T cell recognition

Nature 334: 395-402, 1988

Davis, M.M. und Chien, Y.

Issues concerning the nature of antigen recognition by $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors

Immunol. Today 16: 316-318, 1995

Endl, J., Otto, H., Jung, G., Dreisbusch, B., Donie, F., Stahl, P., Elbracht, R., Schmitz, G., Meinel, E., Hummel, M., Ziegler, A.G., Wank, R. und Schendel, D.J.

Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients

J. Clin. Invest. 99: 2405-2415, 1997

Falk, K., Röttschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Ramensee, H.G.

Sequencing of self peptides eluted from MHC molecules reveals allele specific motifs.

Nature 353: 622-625, 1991

Frohman, E.M., Frohman, T.C., Dustin, M.L., Vayuvegula, B., Choi, B., Gupta, A., van den Noort, S. und Gupta, S.

The induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on human fetal astrocytes by interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha, lymphotoxin and interleukin-1: relevance to intracerebral antigen presentation

J. Neuroimmunol. 23: 117-124, 1989

Gellert, M.

Molecular analysis of V(D)J recombination

Annu. Rev. Genetics 26: 425-446, 1992

Geraghty, D.E, Koller, B.H. und Orr, H.T.

A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9145-9149, 1987

Geraghty, D.E, Wei, X., Orr, H.T. und Koller, B.H.

Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element.

J. Exp. Med. 171: 1-18, 1990

Germain, R.

MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation.

Cell 76: 287-299, 1994

Gilfillan, S., Dierich, A., LeMeur, M., Benoist, C. und Mathis, D.

Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire.

Science 261: 1175-1178, 1993

Grewal, I.S., Grewal, K.D., Wong, S.F., Picarella, D.E., Janeway, C.A.J. und Flavell, R.A.

Local expression of transgene encoded TNF- α in islets prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice by preventing the development of auto-reactive islet-specific T cells.

J. Exp. Med. 184: 1963-1968, 1996

Hardardottir, F., Baron, J.L. und Janeway, C.A.

T cells with two functional antigen-specific receptors

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 354-358, 1995

Hattori, M., Buse, J.B., Jackson, R.A., Glimcher, L., Makino, S., Moriwaki, K., Dorff, M., Minami, M., Kuzuya, H., Imura, H., Seidman, J.G. und Eisenbarth, G.S.

The NOD mouse: recessive diabetogenic gene within the major histocompatibility complex.

Science 231: 733-735, 1986

Heath, W.R., Miller, J.F.A.P

Expression of two α Chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice.

J. Exp. Med. 178: 1807-1811, 1993

Herrath von, M.G. und Oldstone, M.B.A.

Interferon- γ is essential for destruction of β cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus.

J. Exp. Med. 185: 531-539, 1997

Hiom, K. und Gellert, M.

A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage.
Cell 88: 65-72, 1997

Jacob, C.O., Aiso, S., Michie, S.A., McDevitt, J.O. und Acha-Orbea, H.

Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF- α and interleukin 1.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 968-971, 1990

Jones, D.B., Hunter, N.R. und Duff, G.W.

Heat-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes.

Lancet 336: 583, 1990

Kaufmann, D.L., Erlander, M.G., Claesalzheimer, M., Atkinson, M.A., Maclaren, N.K., Tobin, A.J.

Autoimmunity to two forms of glutamate-decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus.

J. Clin. Invest. 89:283-292, 1992

Kaufmann, D.L., Clare-Salzer, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S.T., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J. und Lehmann, P.V.

Spontaneous loss of T cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes.

Nature 366: 69-72, 1993

Klein, J. und Figueroa, F.

Evolution of the major histocompatibility complex.

Crit. Rev. Immunol. 6: 295-387, 1986

Kobayashi, H., Kokubo, T., Abe, Y., Sato, K. Kimura, S., Miyokawa, N. und Katagiri, M.

Analysis of anchor residues in a naturally processed HLA-DR53 ligand.

Immunogenetics 44: 366-371, 1996

Koller, B.H., Geraghty, D.E., Shimizu, Y., DeMars, R. und Orr, H.

HLA-E: A novel HLA-class I gene expressed in resting T lymphocytes.

J. Immunol. 141: 897-904, 1988

Laemmli, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 277: 680-685, 1970

De Libero, G.

Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells

Immunol. Today 18: 22-26, 1997

Mäkelä, O., Cross, A.M.

The diversity and specialization of immunocytes

Progr. Allergy 14: 145

Makino, S., Muraoka, Y., Kishimoto, Y. und Hayashi, Y.

Genetic analysis for insulinitis in NOD mice.

Exp- Anim. 34: 425, 1985

Marrack, P., Ignatowicz, L., Kappler, J.W., Boymel, J. und Freed, J.H.

Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II.

J. Exp. Med. 178: 2173-2183, 1993

McSorley, S.J., Soldera, S., Malherbe, L., Carnaud, S., Locksley, N., Flavell, R. und Glaichenhaus, N.

Immunological tolerance to a pancreatic antigen as a result of local expression of TNF- α by islet cells.

Immunity 7: 401-409, 1997

Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hogdon, J.C., Schlossmann, S.F., Reinherz, E.L.

Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function.

J. Exp. Med. 157: 705-719, 1983

Müller, C., Held, W., Imboden, M.A. und Carnaud, C.

Accelerated β -cell destruction in adoptively transferred diabetes correlates with an increased expression of the genes coding for TNF- α and granzyme A in the intra-islet infiltrates

Diabetes 44:112-115, 1995

Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A.

Expression of two T cell receptor α chains: dual receptor T cells

Science 262: 422-424, 1993

Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valitutti, S., Acuto, O. und Lanzavecchia, A.

Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: Implication for the mechanism of allelic exclusion

J. Exp. Med. 181: 1587-1591, 1995

Panina-Bordignon, P., Lang, R., van Endert, P.M., Benazzi, E., Felix, A.M., Pastore, R.M. Spinas, G.A. und Sinigaglia, F.

Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes.

J. Exp. Med. 181: 1923-1927

Payton, M.A., Hawksw, C.J. und Christie, M.R.

Relationship of the 37- and 40-M_r tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosin phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512).

J. Clin. Invest. 96: 1506-1511, 1995)

Pette, M., Fujita, K., Wilkinson, D., Altmann, D.M., Torwsdale, J., Giegerich, A.,

Hinkkanen, A., Epplen, J.T., Kappos, L. und Wekerle, H.
Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7968-7972, 1990

Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S., Barlow, A. und Janeway, C., Jr.
Sequencing analysis of peptides bound to MHC class II molecules.
Nature 353: 622-627, 1991

Sant, A. und Miller, J.
MHC class II antigen processing: biology of invariant chain.
Curr. Opin. Immunol. 6: 57-63, 1994

Schatz, D.G., Oettinger, M.A. und Schlissel, M.S.
V(D)J recombination: molecular biology and regulation
Annu. Rev. Immunol. 10: 359-383, 1992

Schendel, D.J. und Wank, R.
Production of human T cell growth factor.
Hum. Immunol. 2: 325-332, 1981

Schmidt, D., Verdaguer, J., Averill, N. und Santamaria, P.
A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity.
J. Exp. Med. 186: 1059-1075

Schwartz, R., Momburg, F., Moldenhauer, G., Dorken, B. und Schirmacher, V.
Induction of HLA class-II antigen expression on human carcinoma cell lines by IFN-gamma
Int. J. Cancer 35: 245-250, 1985

Shimoda, S., Nakamura, M., Ishibashi, H., Hayashida, K., Niho, Y.
HLA DRB4*0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases.
J. Exp. Med. 181: 1835-1845, 1995

Svejgaard, A., Platz, P. und Ryder, L.P.
"Histokompatibilitätstestung 1980".
Seite 656, Springer-Verlag, New York, 1980

Svejgaard, A., Platz, P. und Ryder, L.P.
HLA and disease 1982—a survey.
Immunol. Rev. 70: 193-218, 1983

Thomson, G.

HLA DR antigens and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus.
Am. J. Hum. Genet. 36: 1309-1317, 1984

Thomson, G., Robinson, W.P. et al.

Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus.
Am. J. Hum. Genet. 43: 799-816, 1988

Tian, J., Atkinson, M.A., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Forsthuber, T., Lehmann, P.V., Kaufmann, D.L.

Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes.
J. Exp. Med. 183: 1561-1567, 1996

Tisch, R., Yang, X.D., Singer, S.M., Liblau, R.S., Fugger, L. und McDevitt, H.O.

Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice.
Nature 366: 72-75, 1993

Todd, J.A., Bell, J.I. und McDevitt, H.O.

HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus.
Nature 329: 599-604, 1987

Toyonaga, B. und Mak T.

Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant cells.
Annu. Rev. Immunol. 5: 585-620, 1987

Watts, T.H., McConnell, H.M.

Biophysical aspects of antigen recognition by T cells.
Annu. Rev. Immunol. 5: 461, 1987

Wicker, L.S., Miller, B.J. und Mullen, Y.

Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from non-obese diabetic (NOD) mice.
Diabetes 35 (8): 855-860, 1986

Wicker, L.S., Miller, B.J., Coker, L.Z., McNally, S.E., Scott, S., Mullen, Y. und Appel, M.C.

Genetic control of diabetes and insulinitis in the non-obese diabetic (NOD) mouse.
J. Exp. Med. 165 (6): 1639-1654, 1987

Wicker, L.S., Chen, L., Nepom, G.T., Elliott, J.F., Freed, D.C., Bansal, A., Zheng, S., Herman, A., Lernmark, A., Zaller, D.M., und andere

Naturally processed T cell epitopes from human glutamic acid decarboxylase identified using mice transgenic for the type 1 diabetes-associated human MHC class II allele, DRB1*0401.
J. Clin. Invest. 98: 2597-2603, 1996

Williams, D.B. und Watts, T.H.

Molecular chaperones in antigen presentation.

Curr. Opin. Immunol. 7: 77-84, 1995

Wucherpfennig, K.W. und Stominger, J.L.

Selective binding of self peptides to disease-associated MHC molecules: a mechanism for MHC linked susceptibility to human autoimmune disease.

J. Exp. Med. 181: 1597-1601, 1995

Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C.

Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.

Nature 248: 701-702, 1974

Herzliches Dankeschön!!!

... an alle, die mir auf Ihre Art und Weise beim Anfertigen meines Lebenswerkes geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Dolores Schendel die mich beim Anfertigen dieser Arbeit immer unterstützte und stets für die Hochregulation meiner Optimismusrezeptoren sorgte und Dr. Josef Endl, der mich neben der wissenschaftlichen und finanziellen Unterstützung, auch immer seelisch und moralisch bei der Kultivierung der T-Lymphozyten unterstützte.

Danken möchte ich auch meiner Betreuerin Prof. Dr. Margot Zöller, die mir in wissenschaftlichen Gesprächen, mit ihrem Rat zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Riethmüller möchte ich dafür danken, daß mir an seinem Institut die Tür immer offen stand.

Besonderer Dank geht an:

- Barbara Dreibusch im Labor bei Boehringers in Penzberg , die mit mir durch alle Höhen und Tiefen der mühsamen T-Zell-Kultivierung ging. Und natürlich auch dem Rest der Crew
- die gesamte Arbeitsgruppe Schendel.
Vor allem an Abdo Konur, Bernhard Frankenberger und Birgit Stürer, die mir in wissenschaftlichen und kulinarischen Angelegenheiten immer zur Seite standen; besonders an Bernhard, der mir gerade in der Endphase dieses Werkes sehr viel geholfen hat; Anna Brandl, die mir bei "gelegentlichen" Zigarettenpausen immer eine schöne Gesellschaft war; Christine Falk, die stets hilfsbereit war und mich mit ihrer Liebe zur Wissenschaft motivierte; Babs Maget, die mit ihrem Organisationstalent stets für Recht und Ordnung sorgte; Elfriede Nößner und Petra Jantzer für ihre wissenschaftlichen Ratschläge; Gerti Schmid dafür, daß uns das Arbeitsmaterial nie ausging; Heike Pohla und Alex Buchner für die Organisation der Posterdrucke
- das gesamte Institut für Immunologie, für die nette Arbeitsatmosphäre
- die Arbeitsgruppe Wank für ihre Hilfsbereitschaft und das Zur-Verfügung-Stellen der peripheren Blutlymphozyten aus ihren HLA-Kontrollpanel
- natürlich auch an die vielen Blutspender ohne die meine T-Zellen schon längst verhungert wären: Armin Koroknay, Petra Jantzer und viele andere
- Christine Jung aus Tübingen, die mir die HLA-Peptid-Bindungstests beigebrachte
- Klaus Dornmair am MPI in Martinsried und Elisabeth Kremmer am Hämatologikum der GSF, die mir bei der Isolierung der HLA-Moleküle behilflich waren
- meine lieben WG-Mitbewohner Martin, Michael und Hari, die mich in stressigen und unstressigen Zeiten immer liebevoll umsorgt haben; besonders meinem liebsten Martin, ohne den ich beim Schreiben und Drucken dieses Werkes vermutlich verzweifelt wäre
- meine Familie zu Hause, bei der ich jederzeit herzlich willkommen war, um abzuschalten und auszuspannen, und die mich immer seelisch und moralisch unterstützte

Lebenslauf

Carmen Huck

Geboren: 29. Oktober 1966
Rastatt in Baden

Adresse: Parkstr. 25
80339 München

Schulbildung: 1972-1976 Grundschole Sinzheim
1976-1982 Lothar von Kübel Realschole Sinzheim
1982-1985 Wirtschaftsgymnasium Bühl
Abschluß: Abitur

Studium: 1986-1989 Universität Kaiserslautern
Studium der Biologie
Abschluß: Vordiplom
1989-1993 Universität Karlsruhe
Studium der Biologie
Abschluß: Diplom

Diplomarbeit: 1992-1993 Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe
Titel: "Charakterisierung der Faktoren, die in die
mammasspezifische Expression
des Maus Mamma Tumor Virus involviert sind"

Doktorarbeit: 1994-1998 Institut für Immunologie der LMU München
Titel: "Charakterisierung der molekularen Interaktionen bei der
Antigenerkennung glutaminsäure-decarboxylase-reaktiver T-
Lymphozyten beim insulinabhängigen Diabetes mellitus"