Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Direktor: Professor Dr. M. Weller

Calcium-abhängige T-Zell-Signaltransduktion und Multiple Sklerose: Vergleichende Analysen in humanen T-Zellen und in Modellzellen für zelluläre Autoimmunität

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Annette Kathrin Igney
aus
Böblingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Melms
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

INHALT

1. Einleitung 5

1.1. Immunologie und Autoimmunität 5

1.2. Encephalomyelitis disseminata/ Multiple Sklerose 7

1.2.1. Symptomatik 7
1.2.2. Verlauf 8
1.2.3. Therapie 9
1.2.4. Pathogenese 9
1.2.5. Zukunftsperspektive 11

1.3. T-Zell-Signaltransduktion 13

1.3.1. T-Zell-Rezeptorkomplex 13
1.3.2. Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle durch den T-Zell-Rezeptorkomplex 14
1.3.4. Bildung des Calcium-Initiationskomplexes 15
1.3.5. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren 18

1.4. T-Zell-Signaltransduktion und Autoimmunität 22

1.5. Modellzellen für zelluläre Autoimmunität 23

1.6. Aufgabenstellung 24

2. Material und Methoden 26

2.1. Material 26

2.1.1. Zellkulturmedien 26
2.1.2. Untersuchungsmaterial 26
2.1.3. Antikörper 28
2.1.4. PCR-Primer 28
2.1.5. Enzyme und Chemikalien 29
2.1.6. Lösungen und Puffer 29
2.1.7. Geräte und sonstige Materialien 30

2.2. Zellbiologische Methoden 31

2.2.1. Kultivierung der Zellen 31
2.2.2. Isolierung muriner Splenozyten zur ex vivo Analyse 32
2.2.3. Isolierung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) 32
2.2.4. Stimulation von T-Zellen 33
2.2.5. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Durchflußzytometrie 34
2.2.6. Calcium-Imaging 35
2.2.6.1. Konfokale Laser- Scanning- Mikroskopie 35
2.2.6.2. Versuchsdurchführung 36
2.2.7. Il-2 Secretion Assay 38

2.3. Molekularbiologische Methoden 39

2.3.1. Interspezifisches Primerdesign: Human-murine-Oligonucleotid Primer 39
2.3.2. RNA-Isolierung 39
2.3.3. cDNA-Synthese (RT-Reaktion) 40
2.3.4. Konventionelle RT-PCR 40
2.3.5. Relative Quantifizierung der Gen-Expression durch real-time RT- PCR Analyse 41

2.4. Statistische Methoden 42

3. Ergebnisse 43

3.1. Design und Etablierung interspezifischer Primer 43

3.1.1. Interspezifisches Primerdesign wichtiger T-Zell-Signaltrans-duktionsproteine für Calcium-Freisetzung 43
3.1.2. Validierung der Primer in der konventionellen RT-PCR 48

3.2. Vergleichende Expressionsanalysen in humanen T-Zellen gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender 49

3.2.1. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten primären humanen T-Zellen 49
3.2.2. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in humanen primären T-Zellen bei verschiedenen Stimulationsbedingungen 51
3.2.3. Anreicherung Il-2 produzierender Zellen nach MBP-Stimulation mittels Il-2 Secretion Assay in humanen PBMCs 55

3.3. Vergleichende Expressionsanalysen in Modellzellen 55

3.3.1. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten Modellzellen 55
3.3.2. Verlauf der Genexpression ausgewählter Signaltransduktions-proteine in Modellzellen bei verschiedenen Stimulations-bedingungen 56

3.4. Funktionelle Analyse der 58$\alpha^-\beta^-$-Transfektanten und weiteren Modellzellen mittels Calcium-Imaging 62

4. Diskussion 65

4.1. Vergleichende Analysen humaner T-Zellen gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender 65
4.2. Vergleichende Analysen muriner Modellzellen für Autoimmunität mit etablierten humanen Modellzellen 69

5. Zusammenfassung 74

6. Literatur 76

7. Anhang 82

8. Abkürzungen 84

9. Danksagung 86

9. Lebenslauf 87

1. Einleitung

1.1. Immunologie und Autoimmunität

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene aufzuspüren und zu beseitigen, die dem Organismus schaden könnten. Dabei ist die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen für den einzelnen Organismus überlebenswichtig. Dies wird durch die Mechanismen der Immuntoleranz gewährleistet. Körpereigene Strukturen werden zwar vom Immunsystem erkannt, aber nicht attackiert und eliminiert (Nossal, 2001). Das unspezifische und spezifische System (Tabelle 1) arbeiten dabei eng zusammen.

Tabelle 1▼ Einteilung des spezifischen und unspezifischen Immunsystems in die zelluläre und die humorale Abwehr.

	unspezifisches Immunsystem	spezifisches Immunsystem
zellulär	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen	T-Lymphozyten B-Lymphozyten
humoral	Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine, Zytokine	Antikörper

Das spezifische Immunsystem besteht aus zwei Armen, den B- und T-Zellen (Tabelle 1). Die T-Zellen sind entscheidend für die Regulation des Immunsystems (Abbas and Janeway, 2000). Sie sind zu Effektorfunktionen befähigt und haben wichtige Koordinationsaufgaben. T-Zell-Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen werden durch die Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle unterschieden.

$CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen erkennen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene, die als Peptide von MHC-Molekülen der Klasse I beziehungsweise Klasse II präsentiert werden (Abbas and Janeway, 2000). Die $CD4^+$ T-Zellen (T-Helferzellen) regulieren die humorale und die zelluläre Immunreaktion, indem sie Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 und GM-CSF sezernieren. Eine Untergruppe der $CD4^+$ T-Zellen, die Th1- Zellen, helfen bei der Aktivierung von Monozyten

und $CD8^+$ T-Zellen. Die für die Th1-Zellen typischen Zytokine sind IFNγ sowie TNFα. Eine andere $CD4^+$ Untergruppe, die Th2-Zellen, stimulieren eine humorale Immunantwort und unterdrücken die Entwicklung einer Th1-Antwort. Für die Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 typische Zytokine. $CD4^+$ Zellen können auch zytotoxische Aktivität zeigen. Eine weitere Untergruppe, die regulatorischen T-Zellen wirken suppressiv auf autoreaktive T-Zellen. Diese $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen, exprimieren das Schlüsselregulationsgen Foxp3 (Sakaguchi S., 2003). Ihre exakte Bedeutung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. $CD8^+$ T-Zellen können Zellen lysieren und werden deshalb als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie sind unter anderem für die frühe Abwehr viraler Infektionen wichtig und können Tumorzellen töten.

Kommt es zu Störungen der T-Zell-Regulation und somit zu Störungen der Immuntoleranz, werden körpereigene Strukturen angegriffen. Die daraus resultierenden Erkrankungen werden als Autoimmunerkrankungen bezeichnet (Nossal, 2001). Diese werden durch Autoantikörper oder autoreaktive T-Lymphozyten hervorgerufen. Bei den meisten Autoimmunerkrankungen sind beide Arme des Immunsystems an der Pathogenese beteiligt, da T-Lymphozyten die Antikörperproduktion regulieren und B-Lymphozyten den T-Zellen auch Antigene effizient präsentieren. Jedoch dominiert einer der beiden Arme bei vielen Autoimmunerkrankungen (Tabelle 2).

Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen die genetische Disposition (vor allem im Hinblick auf MHC-II-Moleküle), Umweltfaktoren, aber auch Tumore, Medikamente, Nahrungsstoffe oder Infektionen eine Rolle. Ziel ist es, mit Hilfe der Identifizierung der richtigen Autoantigene zu versuchen, die Aktivität der autoimmunen Zellen und der beteiligten regulatorischen Mechanismen zu kontrollieren.

Tabelle 2 ▼ Einteilung von Autoimmunerkrankungen nach Coombs und Gell. Oft dominiert einer der beiden Arme des Immunsystems. Bei Typ II und III die B-Zellen, bei Typ IV die T-Zellen.

Typ II: Antikörper gegen Zelloberflächen/Matrixantigene
Goodpasture-Syndrom, autoimmune hämolytische Anämie, Myasthenia gravis, thrombozytopenische Purpura, Pemphigus vulgaris, M.Basedow, insulinresistenter Diabetes mellitus
Typ III: Immunkomplexerkrankungen
Systemischer Lupus erythematodes, Arteriitis temporalis, allergische Alveolitis, Poststreptokokken-Glomerulonephritis
Typ IV: T-Zell-vermittelte Erkrankungen
Multiple Sklerose (Th1-vermittelt), experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (Th1/Tiermodell) , Rheumatoide Arthritis (Th1), insulinabhängiger Diabetes mellitus ($CD8^+$), Psoriasis (Th1)

1.2. Multiple Sklerose

1.2.1. Symptomatik

Die Multiple Sklerose (Enzephalomyeltis disseminata) ist die häufigste entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie weist in Mitteleuropa eine Häufigkeit von über ein Promille auf. Es erkranken vor allem Erwachsene zwischen 20 und 45 Jahren, Frauen häufiger als Männer (w:m = 2:1).

Ein disseminiertes Symptombild (multilokuläre Funktionsstörungen des ZNS) sowie der chronisch rezidivierende Verlauf sind charakteristisch für die MS.

Frühsymptome sind oft eine Neuritis nervi optici und Doppelbildersehen durch Augenmuskellähmungen (Delank and Gehlen, 2001). Das klinische Spektrum ist breit gefächert. Folgende Symptome können im Rahmen der Erkrankung vorkommen: Zu den häufigsten Symptomen im Bereich der Motorik zählen zentrale Mono-, Para- oder Tetraparesen mit gesteigerten Eigenreflexen, aufgehobenen Fremdreflexen, spastischer Tonuserhöhung und

Pyramidenbahnzeichen. Sensibilitätsstörungen kennzeichnen das typische Bild der MS. Es können sowohl Parästhesien als auch Störungen des Vibrations- und Lagesinnes auftreten. Ferner sind zerebelläre Symptome, die mit Ataxie, Koordinationsproblemen, Intentionstremor, Feinmotorikstörungen und Nystagmus einhergehen, häufig. Außerdem finden sich Beeinträchtigungen der vegetativen Funktionen (Störungen der Blasen,- Darm- und Sexualfunktionen) sowie neuropsychologische Störungen: insbesondere in späteren Krankheitsstadien kognitive Beeinträchtigungen, Konzentrationsstörungen und selten Demenz. Depressive Verstimmungen, Müdigkeit und Abgeschlagenheit (Fatigue) gehören oft zu den subjektiv belastendsten Beschwerden.

Die Diagnosesicherung liefern schließlich

1. der typische, pathologische Liquorbefund (leichte lymphoplasmazytäre Pleozytose bis 150/3 Zellen, Vermehrung des IgG als oligoklonale, zerebrogene Produktion, Delpech-Quotient > 0,7, normaler Totalproteingehalt),
2. die Latenzzeitverlängerungen von MEP und VEP und
3. die in der Kernspintomographie nachgewiesenen multiplen Entmarkungsherde (Plaques), die sich vor allem in der weißen Substanz des ZNS, vorwiegend periventrikulär, im Hirnstamm, im Kleinhirn, im Rückenmark und im Nervus optikus zeigen.

1.2.2. Verlauf

Es werden drei klinische Verlaufsformen unterschieden: Zu Beginn der Erkrankung ist der schubförmig remittierende Verlauf am häufigsten. Bei ungefähr der Hälfte der Patienten entwickelt sich daraus innerhalb von 10 Jahren eine sekundär chronisch progrediente Form. Diese ist gekennzeichnet durch eine schleichende Verschlechterung. Schübe können zusätzlich hinzukommen. Bei nur 15 % der Patienten liegt ein primär chronisch progredienter Verlaufstyp vor, bei dem sich von Krankheitsbeginn an eine kontinuierliche Verschlechterung findet. Zeitweiliges Sistieren auf einem bestimmten Krankheitsniveau kann vorkommen. Die Letalität 20 Jahre nach der Erkrankung beträgt 20%.

1.2.3. Therapie

Zur Therapie des akuten Schubes werden hochdosierte Korticosteroide eingesetzt. Zur Immunprophylaxe IFNβ, Cop und Azathioprin. Weiterhin können Zytostatika wie z.B. Mitoxantron eingesetzt werden. Auch die symptomatische Therapie spielt eine große Rolle (Antispastika, Krankengymnastik).

1.2.4. Pathogenese

In den Plaques findet sich eine Zerstörung des Myelins und/oder der Oligodendrozyten begleitet von einer Entzündungsreaktion. Das Infiltrat besteht vor allem aus Lymphozyten und Makrophagen (Wingerchuck et al., 2001), aber es können sich auch Immunglobulin- und Komplementablagerungen finden (Lucchinetti et al., 2000). Es wird diskutiert, dass diese Entzündungsherde auch neuroprotektives Potenzial besitzen, was erklären könnte, warum bisherige Therapien mit Immunsuppressiva, Immunmodulatoren und Entzündungshemmern nicht den gewünschten Erfolg bringen (Moalem et al., 1999).

Die unterschiedlichen pathologischen Muster und klinischen Erscheinungsbilder weisen also insgesamt auf differente Schädigungswege hin. Stets jedoch spielen T-Zellen eine Hauptrolle (Martino and Hartung, 1999).

Genetische wie auch Umweltfaktoren (Virusinfektionen, reaktive Metaboliten, bakterielle LPS, unbekannte Ursachen) sind Auslöser dafür, dass autoreaktive T-Zellen, die spezifisch für Selbst-Antigene sind, am Epithel der Bluthirnschranke andocken und diese schließlich passieren können (Steinmann, 1996) (Abb.1). Wichtige Faktoren hierbei sind VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule), VLA-4 (very late antigen 4, auf T-Zellen), LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1) und Matrixmetalloproteinasen (Yong et al., 1998). Antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Mikroglia, Astrozyten) werden durch die Zytokine der aktivierten T-Zellen dazu veranlaßt, den T-Zellen

Antigene auf ihren MHC-II-Rezeptoren zu präsentieren (Steinmann, 1999). Die $CD4^+$ Zellen erkennen nun mit ihrem TCR die mutmaßlichen MS-Antigene. Diese Antigene sind die Myelinproteine MBP (Myelin Basisches Protein), MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein), PLP (Proteolipidprotein), MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein), S-100 Protein, αB-Crystallin (heat shock-protein) und CNPase (Noseworthy et al., 2000). Daraufhin kann es, wenn sowohl kostimulatorische Moleküle (CD28) als auch Liganden vorhanden sind, zu einer starken Immunantwort kommen: Die T-Zellen produzieren Zytokine (IL-2, IFNγ, TNFα), die proinflammatorisch wirken. Wenn dieses Th1-fördernde Zytokinmilieu herrscht, proliferieren die Th1 Zellen (Abb.1).

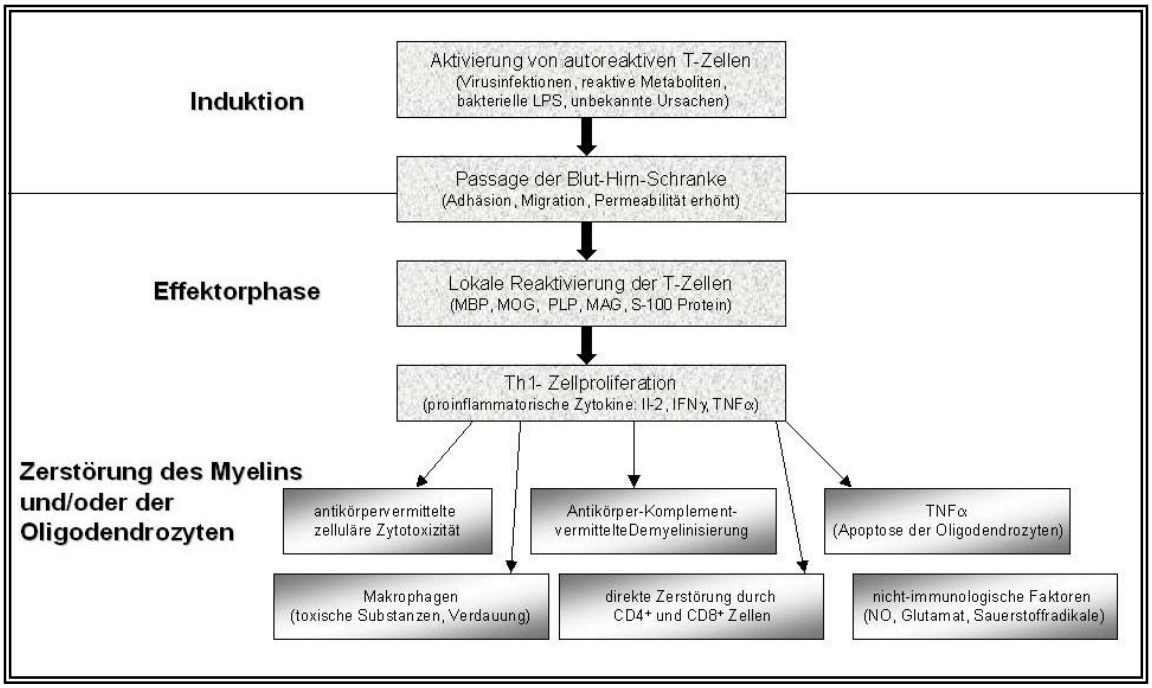

Abb.1 ▲ Pathogenese der Multiplen Sklerose. In der Induktionsphase werden T-Zellen aktiviert, die dann die Blut-Hirn-Schranke passieren. Eine lokale Reaktivierung in der Effektorphase führt zu T-Zellproliferation. Dadurch werden viele Mechanismen in Gang gebracht, die das Myelin und/oder die Oligodendrozyten zerstören.

Die T-Zellen können mit ihren Produkten (IL-2, IFNγ, TNFα) viele Mechanismen in Gang bringen, die zu einer Zerstörung des Myelins und/oder der Oligodendrozyten führen (Lucchinetti et al., 2000):

TNFα führt zu Apoptose der Oligodendrozyten (D´Souza et al., 1996). Außerdem produzieren Makrophagen toxische Substanzen und können

Myelinbestandteile verdauen. Weiterhin sind ADCC (antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität), Antikörper-Komplement-vermittelte Demyelinisierung (Storch et al., 1998) sowie direkte Zerstörung durch $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen (Noseworthy et al., 2000) wichtige Mechanismen. Darüber hinaus können nicht-immunologische Faktoren (NO, Glutamat, Sauerstoffradikale) (Smith et al., 1999) an der Zerstörung des Myelins und/ oder der Oligodendrozyten beteiligt sein (Abb.1).

Dadurch entstehen Entmarkungsherde, die die typischen neurologischen Symptome hervorrufen.

Es gibt jedoch viele physiologische Reparaturmöglichkeiten, was den chronisch remittierenden Verlauf widerspiegelt. Die $CD4^+$ Th2 Zellen, die nach anergischen Signalen der eingedrungenen T-Zellen (IL-1, IL-4, IL-10) aktiviert werden, können mit ihren Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) die Entzündung bremsen und Reparaturvorgänge einleiten. Über Vorgängerzellen der Oligodendrozyten kann eine Remyelinisierung eingeleitet werden (Compston, 1997).

Genetische Faktoren, wie die Disposition für Multiple Sklerose bei bestimmten Histokompatibiltätsmerkmalen (HLA-DR2, HLA-DW2, HLA-A3, B7) liefern unter anderem die Voraussetzungen für die Aktivierung des Immunsystems. Als weitere Bedingung für die MS-Entstehung wird eine gewisse Myelinvulnerabilität, bedingt durch eine genetische Enzymopathie, diskutiert (Delank and Gehlen, 2001). Ferner ist bei Verwandten ersten Grades eines MS-Kranken das Risiko 10-fach erhöht.

1.2.5. Zukunftsperspektive

Aus den Erkenntnissen zur Pathogenese ergeben sich viele neue therapeutische Strategien, die allesamt die Zerstörung des Myelins aufhalten oder die Remyelinisierung fördern sollen (Noseworthy, 1999), (Wingerchuck et al., 2001):

- Modulation der Adhäsionsmoleküle, Inhibition der Matrix-Metalloproteinasen
- Reduzierung der T-Zellaktivierung durch Anti-Chemokine/Integrine , Peptid-Immuntherapie, T-Zellvakzinierung und Anti B7-Antikörper

- Förderung der antiinflammatorischen Th2-Zellen sowie Anti-Th1-Zytokine
- Inhibiton der humoralen Antwort: Anti-Autoantikörper, Komplementinhibitoren
- Antivirale oder antibakterielle Therapie
- Anregung der Oligodendrozytenvorläuferzellen durch Wachstumshormone
- Neuroprotektive Agenzien

Da noch viele grundlegende Fragen offen sind, steht an oberster Stelle die Aufgabe, ein genaueres Verständnis über die entscheidenden Krankheitsursachen und -vorgänge zu erlangen. Dies ist nicht nur für die MS von Bedeutung, sondern darüber hinaus für ein äußerst weitreichendes Spektrum von Autoimmunkrankheiten. Hierbei sind Erkenntnisse über das Geschehen in den T-Zellen ein wichtiger Meilenstein.

1.3. T-Zell-Signaltransduktion

1.3.1. T-Zell-Rezeptorkomplex

Auf T-Zellen wurden zwei verschiedene TCR-Komplexe beschrieben, die beide heterodimere Glykoproteine darstellen. 95-99 % der Rezeptorkomplexe bestehen aus einer α- und einer β-Kette, die miteinander durch eine Disulfidbrücke zu einer Struktur verbunden sind (Abb.2). Daneben existieren auch T-Zellen mit einer γ- und einer δ-Kette (1-5%), die kovalent oder nicht-kovalent miteinander assoziiert sein können. Der TCR ähnelt einem membranassoziierten Immunglobulin-Fab-Fragment. Er ist also nur monovalent im Gegensatz zu den bivalenten Immunglobulinen. Außerdem wird er nie sezerniert, es bestehen andere Bindungswinkel zwischen den Ketten und es gibt weniger Kontakte zwischen den beiden V-Domänen. Die α-Ketten werden aus V- (variable), J- (joining) und C- (constant) Segmenten zusammengebaut. Bei den β-Ketten existieren zusätzlich D- (diversity) Segmente.

Die Proteinstruktur der TCR-Ketten besteht jeweils aus einem extrazellulären Anteil mit je zwei Domänen, einem transmembranären und einem zytoplasmatischen Anteil. Der V-Bereich bildet die membrandistale Domäne aus, während sich der C-Bereich in den membranproximalen, den transmembranären und zytoplasmatischen Anteil gliedert. Die beiden extrazellulären Domänen sind durch ein Peptid verbunden, das aus J-, bzw. D- und J-Sequenzen besteht. Der VDJ-Bereich dient der Antigenerkennung, während der C-Bereich für die Verankerung in der Zellmembran verantwortlich ist (Janeway and Tavers, 1997). Die Variabilität des TCR wird durch unterschiedliche Kombinationen und Umordnungen der vielen VJ- bzw. VJD-Segmente bedingt und durch weitere molekulare Mechanismen bei der Rekombination gesteigert.

Der TCR dient zur Antigenerkennung und ist mit Proteinen für die intrazelluläre Signaltransduktion assoziiert (CD3 γ, δ, ε, TCR η- Kette) (Abb.2). Sie sind in der Transmembranregion über Salzbrücken miteinander verbunden. Die zytoplasmatischen Domänen enthalten sogenannte ITAMs (immuno-receptor

tyrosine-based activation motifs). Sie ermöglichen die Übertragung ins Zellinnere über die Assoziation mit Proteintyrosinkinasen (Wange and Samelson, 1996).

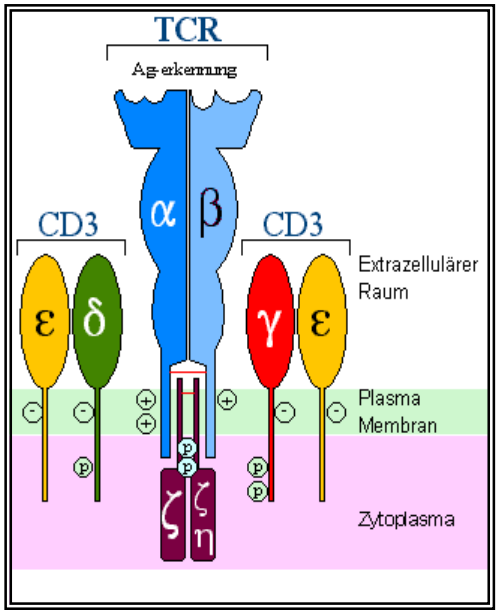

Abb. 2 ▲ T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplex. Der T-Zellrezeptor besteht aus der α- und β-Kette und ist assoziiert mit Proteinen für die intrazelluläre Signaltransduktion (CD3 γ,δ,ε,η, TCR ζ-Kette). Positiv (+) und negativ (–) geladene Bereiche gewährleisten die Verbindung des TCR:CD3-Komplexes mittels Salzbrücken. Über die Phosphorylierung (P) der Proteinketten erfolgt die kaskadenartige Übertragung der Aktivierung ins Zellinnere. (FU-Berlin/Copharma)

1.3.2. Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle durch den T-Zell-Rezeptorkomplex

Die Übertragung des Signals in das Zellinnere erfolgt kaskadenartig über den TCR-assoziierten CD3-Komplex (Abb.2).

Die beiden Tyrosinkinasen Fyn und Lck (Src-family: p59 und p56), die konstitutiv mit CD4 bzw. 8 verbunden sind, initieren den Signaltransduktionsprozess durch einen noch nicht ganz aufgeklärten Mechanismus. Die Tyrosinkinasen phosphorylieren Schlüssel-Tyrosinreste in den ITAMs (Dustin and Chan, 2000). Diese bilden das Grundgerüst für den Beginn der Signaltransduktionskaskade und koordinieren die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, die alle eng miteinander verflochen sind und sich gegenseitig beeinflussen. Diese führen letztendlich alle entweder

zur Transkriptionsaktivierung für Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion oder zur Reorganisation des Zytoskeletts, die ein effizientes TCR-Signaling gewährleistet.

Es können vereinfacht drei Signaltransduktionswege unterschieden werden (van Leeuwen and Samelson, 1999) (Abb.3): erstens der Weg über die PLCγ, der durch Ca^{2+}-Freisetzung und über Calcineurin zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktor-Familie NFATc1-c4 führt (Okamura and Rao, 2001); zweitens der MAP-Kinasen-Weg, der eine Aktivierung von c-Jun und Fos und damit des Transkriptionsfaktorkomplexes AP1 zu Folge hat; drittens der Weg über DAG (Diacylglycerin) und PKC (Proteinkinase C), der den Transkriptionsfaktor NFκB (Sun and et al., 2000) und auch den AP1-Komplex aktiviert (Baier-Bitterlich and et al., 1996). Diese Transkriptionsfaktoren arbeiten bei der Regulation der Effektorfunktionen eng zusammen (Macián et al., 2001), (López-Rodríguez et al., 2001).

Außerdem gibt es Transkriptionsfaktoren, die selektiv in bestimmten Untergruppen exprimiert sind wie GATA3 in Th2-Zellen (Ouyang et al., 2000), T-Bet in Th1-Zellen (Szabo et al., 2000) und Foxp3 in regulatorischen T-Zellen (Hori S. et al., 2003). Inwieweit diese für die verschiedenen Funktionen von Bedeutung sind, ist noch offen.

1.3.4. Bildung des Ca^{2+}-Initiationskomplexes

Nach der Initiation des Signaltransduktionsprozesses durch die Proteintyrosinkinasen (PTKs) Fyn und Lck, kann der molekulare Mechanismus folgendermaßen ablaufen: Die beiden PTKs generieren Bindungsstellen für die SH2-Domänen von ZAP-70 (zeta associated protein) (Tabelle 3, Tabelle 4) und phosphorylieren schließlich diese wichtige Tyrosinkinase (Syk-Familie). Die PTKs formen Bindungsstellen für weitere Zielproteine über Interaktionen von SH2-Domänen und phosphorylierten Tyrosin-Resten (Tabelle 3). Es bilden sich Cluster von wichtigen Molekülen, die für die nötige Konzentration um den TCR sorgen und damit erst die Weitergabe eines Signals ermöglichen (Mustelin et al., 2002).

Tabelle 3 ▼ Wichtige Proteindomänen und gebunden Motive der TCR-Signaltransduktionswege.

Proteindomnänen:		
SH2	Src-homology 2	bindet P-Y (phosphorylierte Tyrosin-enthaltende Motive)
SH3	Src-homology 3	bindet Prolin-reiche Sequenzen
PTB	phosphotyrosine binding	bindet P-Y enthaltende Motive
PH	pleckstring homology	erkennt spezifische Phosphoinositide
TM	Transmembrandomäne	
ZF	Zinc-finger	bindet Rac/RHO-GTPasen
Gebundene Motive:		
P-Y	phosphoryliertes Tyrosin	bindet SH2, PTB-Domänen
Pro	Proline reich	binden v.a. SH3-Domänen

Tabelle 4 ▼ Aufbau wichtiger Signaltransduktionsmoleküle. Die Proteindomänen und ihre Interaktionsmöglichkeiten sind entscheidend für die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade.

Src-PTK	--SH3-SH2(+P-Y)---PTK-Domäne(+P-Y)-
Syk-PTK	-SH2-P-Y-SH2--P-Y--PTK-Domäne(+P-Y)-
Tec-PTK	-(PH)-(Pro)-SH3-SH2(+P-Y)-PTK-Domäne(+P-Y)-
LAT	--TM--------P-Y--
SLP-76	--P-Y----Pro---SH2-
Gads	-SH3-SH2-Pro-SH3-
PLCγ1	-PH--PLC-Domäne--P-Y--SH2--SH2--SH3--SH3—PLC--
Grb2	-SH3-SH2-SH3---
PI3K p85	-SH3-Pro--SH2--SH2-
Vav	-GEF-Domäne-PH-ZF-P-Y-SH3-SH2-SH3-

Der entstehende Membran-assoziierte- Ca^{2+}-Initiationskomplex (Leo et al., 2002) bildet das Gerüst für die Signaltransduktionsvorgänge (Abb.3) und ist essentiell für die Ca^{2+}-Freisetzung: er besteht aus

1. LAT, welches ein transmembranes Adapterprotein (TRAP) darstellt und als Ankerprotein für SH2-Domänen weiterer Effektormoleküle und Adaptormoleküle dient (Tabelle 4). LAT ist also wichtiges Gerüstmolekül (Zhang et al., 1998).
2. Gads und SLP-76 (zwei zytosolische Adapterproteine), die für die optimale Aktivierung des Ras-Weges und die Ca^{2+}-Freisetzung verantwortlich sind (van Leeuwen and Samelson, 1999) und somit auch ein multifunktionales Gerüstprotein darstellen.
3. den Proteintyrosinkinasen der Tec-Familie: Itk, Tec, Rlk/Txk, die zusammen mit ZAP-70 für die Phosphorylierung und Aktivierung der PLCγ1 zuständig sind (Lewis C.M. et al., 2001).
4. der PLCγ1, die über die Hydrolysierung von Phosphatidylinositol-biphosphat (PIP_2) die second messenger Inositol (1,4,5)-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) generiert (Putney and Ribeiro, 2000).
5. aus Vav, einem Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor für Rac, der sowohl für die Calcium-Freisetzung wichtig ist, als auch für die Aktivierung des Ras-Weges (Cantrell, 1998).
6. dem Grb2/SOS-Komplex, der zur p21ras-Aktivierung beiträgt (Schaeffer and Schwartzberg, 2000).

ZAP-70 hat dabei die Aufgaben, die Rekrutierung von PLCγ zu ermöglichen und dieses zu phosphorylieren, sowie die Rekrutierung von Vav und die Phosphorylierung von LAT und SLP-76 (van Leeuwen and Samelson, 1999). Die Phosphorylierung von LAT führt zur Rekrutierung von Proteinen: LAT bindet die beiden Adapterproteine Gads und SLP-76, das nach Phosphorylierung durch ZAP-70 eine Bindungsstelle für Itk bildet (Abb.3). Für die Itk-Aktivierung sind die Aktivierung der Src-PTK-Familie und die Generierung von PIP_3 durch die PI3K nötig (Lewis C.M. et al., 2001). Weiterhin bindet LAT Grb2/SOS und

schließlich PLCγ1, die außer durch ZAP-70 auch durch Itk phosphoryliert und damit aktiviert wird (Wange, 2000).
Die Bestandteile des SLP-76/ LAT/ Grb2/ Vav-Komplexes sind alle für eine optimale Ca^{2+}-Mobilisierung und Aktivierung des Ras-Weges nötig (van Leeuwen and Samelson, 1999). Vav wird über Produkte der PI3K (Cantrell, 1998) und verschiedene PTKs wie Lck, Fyn und ZAP-70 positiv reguliert (Turner and Billadeau, 2002).

1.3.5. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

Der erste second messenger der IP3 der PLC□ıbindet an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und verursacht dadurch eine Ca^{2+}-Mobilisierung aus intra- und extrazellulären Beständen (Lewis, 2001) (Abb.3). Fyn kann die Aktivität des IP3-Rezeptors erhöhen und bestätigt damit die wichtige Rolle für die Calcium-Freisetzung (Jayaraman et al., 1996). Darüber hinaus zeigen $Fyn^{-/-}$ Mäuse eine reduzierte Calcium-Freisetzung (Appleby et al., 1992). Ca^{2+} bewirkt über Calmodulin und Calcineurin die Dephosphorylierung von NFATc, so dass dieser Transkriptionsfaktor zu seinem Wirkort, dem Zellkern, und damit zu seinen regulatorischen DNA-Sequenzen vordringen kann. Calcineurin ist der Angriffspunkt der Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506. Sie hemmen diese Proteinphosphatase. Über Gsk3 kann Calcineurin wieder rephosphoryliert werden.
Der zweite second messenger der PLCγ1, DAG, kann über eine Aktivierung der PKC die Phosphorylierung und damit Abspaltung des inhibitorischen IκB von NFκB bewirken. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert (Sun and et al., 2000). Die PKC wird wiederum auch durch Bindung von Ca^{2+} zur Membran lokalisiert. DAG hilft weiterhin bei der Aktivierung des p21ras-Signaltransduktionsweges (Roose and Weiss, 2003) (Abb.3).
Eine Inhibition von Signalwegen ist für die Begrenzung einer T-Zellantwort sehr wichtig: Beispielsweise phosphoryliert Csk inhibitorische Tyr-Reste, so dass die Src-Kinasen inaktiv bleiben und das Adapterprotein Cbl-b kann über seine

Ring-Finger-Domäne E2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme binden. Cbl-b reguliert z.B. Fyn, ZAP-70 und Vav negativ (Koretzky and Myung, 2001).

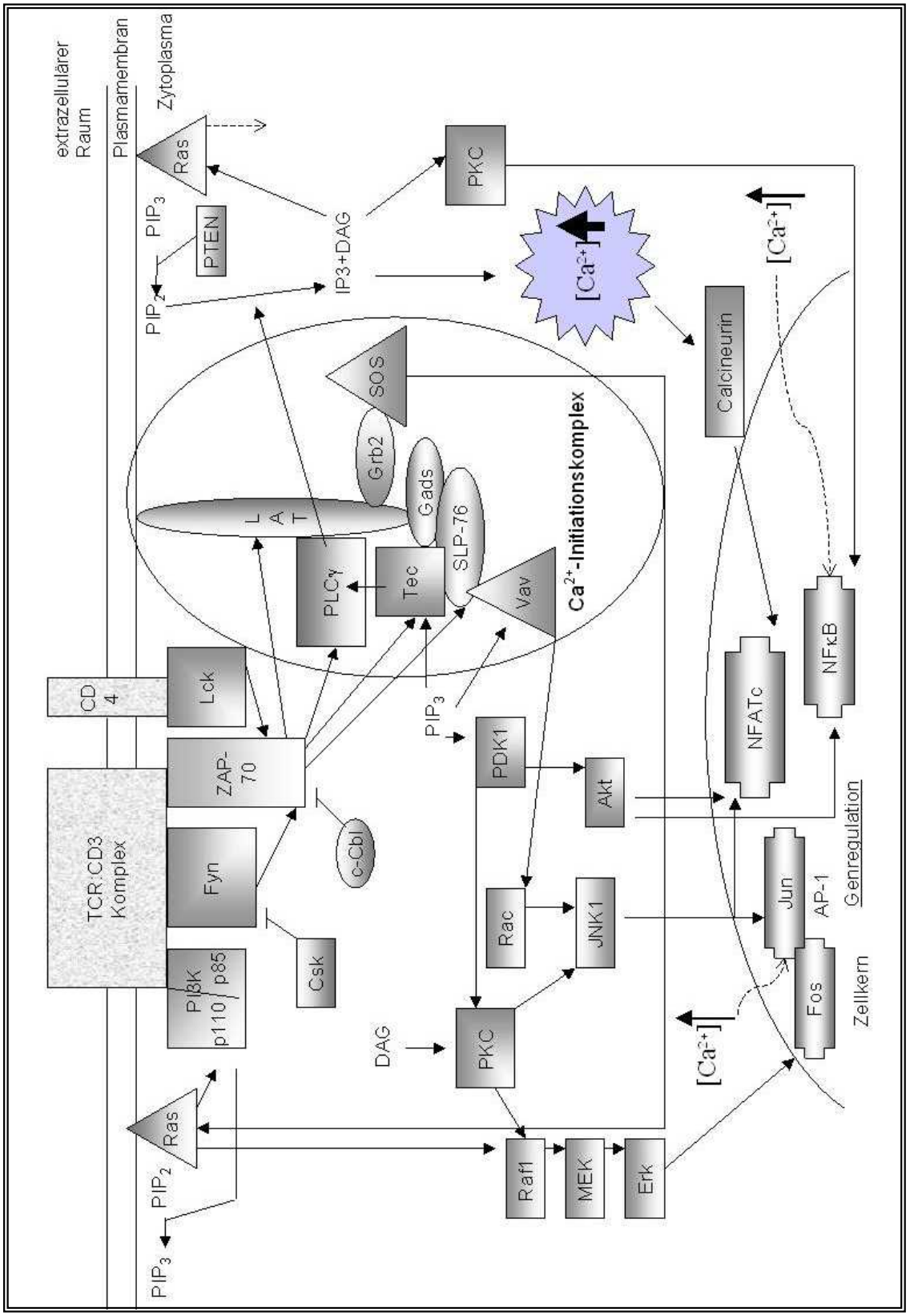

Abb.3 ▲T-Zell-Signaltransduktionswege. Die Übertagung in das Zellinnere erfolgt kaskadenartig über den TCR-assoziierten CD3-Komplex. Tyrosinkinasen initieren den Signaltransduktionsprozess, der über verschiedene Wege zu Transkriptionsaktivierung und Genregulation führt.

Der Guanin-Nucleotid-Austausch Faktor SOS (son of sevenless) ist für die Aktivierung des Ras-Weges ein wichtiger Aktivator. Durch ihn werden nacheinander Raf1 (Ser/Thr-MAPKKK), Mek (MAPKK) und Erk (MAPK) aktiviert (Roose and Weiss, 2000). Der Transkriptionsfaktor Fos kann dadurch in den Zellkern

gelangen. Dessen Partner für den AP1-Komplex, c-Jun, wird über den PI3K/Vav/Rac-Weg mittels der Aktivierung der Ser/Thr-MAPKinasen MEKK, JNKK und JNK in den Zellkern gebracht (Abb.3).

Die PI3Ks sind eine große Familie von Kinasen, die aus einer katalytischen Untereinheit (p110) und aus einer regulatorischen Untereinheit (p85) bestehen. Sie werden an phosphorylierte ITAMs durch ihren Adapter p85 gebunden, dadurch an die Membran lokalisiert und anschließend direkt oder durch Ras aktiviert (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). PI3K phosphoryliert $PI(4,5)P_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat) und produziert $PI(3,4,5)P_3$ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) (Ward and Cantrell, 2001). Diese Produkte können PH-Domänen binden und dadurch eine Lokalisation von Proteinen zu definierten Plasmamembranarealen bewirken, wo eine Aktivierung stattfinden kann (Tec-PTKs, Vav, PDK1) oder sie induzieren in Verbindung mit der Translokation Konformationsänderungen in Proteinen (Rameh and Cantley, 1999). Inositollipid-Phosphatasen wie PTEN sorgen für ein negatives Feedback, indem sie PIP_3 zu PIP_2 abbauen (Maehama and Dixon, 1999), (Rohrschneider et al., 2000).

Akt (PKB) ist eine Ser/Thr-Kinase, die durch Produkte der PI3K zur Plasmamembran gebracht wird, um dort von PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase 1) aktiviert zu werden. Sie phosphoryliert und deaktiviert Gsk3, die inhibitorisch auf NFAT wirkt, und IkB, der Inihibitor von NFκB (Frauwirth and Thompson, 2002). Außerdem stellt sie einen Apoptoseschutz dar. Ihre genaue Rolle bei der T-Zell-Aktivierung ist noch nicht ganz geklärt (Kane et al., 2001).

Der MAP-Kinasen Weg, sowie Vav und Nck spielen auch bei der Reorganisation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle (Dustin and Chan, 2000).

Insgesamt werden NFκB und c-Jun eher durch rasche, starke Ca^{2+}-Konzentrationserhöhung (Ca^{2+}- Spikes) aktiviert, NFAT durch geringere, aber länger andauernde Ca^{2+}-Plateaus. Das zeigt, daß die Signaltransduktionswege auf unterschiedlichen Ebenen eng miteinander verknüpft sind (Feske et al., 2001) (Abb.3).

Für eine optimale Aktivierung ist nach der Bindung des über ein MHC-Molekül präsentierten Antigens an den TCR auch die Aggregation des TCR mit dem CD4- bzw. CD8-Korezeptor erforderlich. Diese erhöhen die Empfindlichkeit der T-Zellen für ein Antigen um ungefähr das 100fache. Für die Aktivierung von Effektorzellen werdenKostimuli wie CD28 und ICOS über eine Assoziation mit B7 und ICOSL benötigt (Frauwirth and Thompson, 2002), (Sharpe and Freeman, 2002).

In den letzten Jahren gab es einen enormen Fortschritt im Verständnis des molekularen Geschehens der T-Zell-Aktivierung. Gleichzeitig jedoch ist immer noch unklar, wie die Reaktion einer T-Zelle auf einen bestimmten Stimulus vom physiologischen Kontext beeinflußt wird (Stefanová et al., 2003).

Neue Erkenntnisse darüber kommen nicht nur der Forschung über Autoimmunerkrankungen zu Gute, sondern sie dienen auch dem Fortschritt in der Transplantations- und Infektionsmedizin sowie der Krebsforschung (Igney and Krammer, 2002).

1.4. T-Zell-Signaltransduktion und Autoimmunität

Eine der Aufgaben der Autoimmunforschung ist es, herauszufinden, wie eine unkontrollierte T-Zellantwort stattfindet, um diese zu verhindern oder aufzuhalten. Um die richtigen Angriffspunkte für eine Therapie zu finden, ist es essentiell, die wichtigsten Proteine herauszufiltern (Bolen and Brugge, 2002).
In zahlreichen Arbeiten wurden bestimmte T-Zell-Signaltransduktionsproteine für die Entstehung von Immundefekten und Autoimmunität verantwortlich gemacht (Grunebaum and Roifman, 2001; Ohashi, 2002; Salojin et al., 1997).
Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass Änderungen in der Expression von Signaltransduktionsproteinen ein wichtiger Faktor bei der Modulation von T-Zellaktivitäten und bei der T-Zellaktivierung sind (Slifka and Whitton, 2001), (Riley et al., 2002).
So wird z.B. eine verminderte p56lck Expression in den PBMCs von Diabetes TypI Kranken und in T-Zellen aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet (Nervi et al., 2000; Romagnoli et al., 2001). Es wurde ferner beschrieben, dass durch Blockade von PI3Kγ bei Mausmodellen für rheumatoide Arthritis oder Lupus erythematodes eine autoimmune Reaktion supprimiert werden konnte (Camps et al, 2005; Barber et al., 2005).
Cbl-b reguliert Fyn, ZAP-70 und Vav negativ. Cbl-defiziente Mäuse zeigen vermehrtes Auftreten von EAE (Bachmaier et al., 2000; Chiang et al., 2000). Veränderte Fyn- und PLCγ– Expressionen werden in Zusammenhang gebracht mit autoimmune nonobese diabetischen (NOD) Mäusen (Salojin et al., 1997). Und eine hohe ZAP-70 Expression begünstigt die Reifung von Th1-Zellen bei MBP-autoreaktiven T-Zellen (Singh et al., 1999). Außerdem wird in der Literatur beschrieben, dass die ZAP-70-Expression mit der Krankheitsprogression von CLL korreliert (Crespo et al., 2003), die ja auch eine Erkrankung mit gestörter T-Zellfunktion ist. Mutationen im ZAP-70-Gen führen zu autoimmuner Arthritis bei Mäusen (Sakaguchi et al., 2003). Eine Veränderung von Vav führt laut Versuchen an Vav-defizienten Mäusen zu Zeichen von Autoimmunität (Ohashi, 2002; Krawczyk and Penninger, 2001). Bei klinisch aktiver MS korreliert die

Krankheitsaktivität mit der Expression von Survivin in den T-Zellen (Sharief et al., 2002).
Wenn sich Korrelationen von Expressionen bestimmter Proteine zu klinischen oder prognostischen Faktoren bestätigen würden, würde dies ein großes Potential für viele klinische Anwendungsmöglichkeiten darstellen.
Insgesamt würde eine Aufklärung der komplexen Zusammenhänge zwischen der T-Zell-Signaltransduktion und der Existenz von Autoimmunität die Entwicklung von therapeutischen Interventionsmöglichkeiten immens fördern.

1.5. Modellzellen für zelluläre Autoimmunität

Für die Analyse der Signaltransduktionskomponenten wird ein Modellsystem für zelluläre Autoimmunität benötigt. Es soll die Charakteristika der natürlichen MHC-TCR-Interaktionen reproduzieren können und gleichzeitig auch eine Differenzierung zwischen den Beiträgen des TCR und der kostimulatorischen Moleküle ermöglichen.
Diese Kriterien erfüllen die murine BW58$\alpha^-\beta^-$ -Modellzelle und deren Transfektanten. Die BW58α-β- Zelllinie (murines T-Zell-Hybridom/ Thymom) besitzt keinen TCR, ist aber bereits transfiziert mit murinem CD4 (Letourneur 1989, Blank, 1993), aber nicht mit CD8. Eine TCRα– und TCRβ -cDNA wurde von einem CD4 positiven T- Zellklon eines MS-Patienten isoliert, in RSV5 Vektoren kloniert und in BW58α-β- transfiziert (Wiendl, 2002). Dadurch wird auch die Oberflächenexpression von CD3 wiederhergestellt, was mit Antikörpern gegen CD3 und Vβ9 des TCR bewiesen wurde. Auch konnte eine Il- 2 Produktion nach antiCD3- Stimulation die Funktionalität des TCR nachweisen (Wiendl, 2002). Die zusätzlich mit einem humanen CD28-Korezeptor transfizierte BBC-CD28-Modellzelle ermöglicht Untersuchungen über den Einfluss dieses Korezeptors. Die Transfektanten sind spezifisch für Epitope, die mutmaßliche MS-Antigene darstellen (MBP 139- 151 in HLA- DR1= BBC-Modellzelle, MBP 80- 99 in HLA-DR2a = SS8-Modellzelle). Die Modellzellen können physiologisch über Fibroblastenzellen (DR1 bzw. 2a)

stimuliert werden. Die BBC- und SS8- Zellen stellen deshalb ein Modellsystem für zelluläre Autoimmunität dar.

1.6. Aufgabenstellung

In zahlreichen Arbeiten wurden bestimmte T-Zell-Signaltransduktionsproteine für die Entstehung von Immundefekten und Autoimmunität verantwortlich gemacht (Grunebaum and Roifman, 2001; Ohashi, 2002; Salojin et al., 1997). Aktuelle Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass Änderungen in der Expression von Signaltransduktionsproteinen ein wichtiger Faktor bei der Modulation von T-Zellaktivitäten und bei der T-Zellaktivierung sind (Slifka and Whitton, 2001), (Riley et al., 2002).

Es sollten Schlüsselproteine der T-Zell-Signaltransduktion identifiziert werden, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunität stehen könnten und gleichzeitig für eine effiziente Ca^{2+}-Freisetzung erforderlich sind. Es sollten humane native T-Zellen von Gesunden und an Multiple Sklerose Erkrankten untersucht werden. Um die Vergleichbarkeit zu einem murinen Modellsystem zu ermöglichen, sollten interspezifische Primer für die definierten Signaltransduktionsproteine generiert werden. Die Genexpressionen sollten vor und nach verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden. Es sollte ermittelt werden, welche Charakteristika bei humanen nativen T-Zellen bestehen und ob sich Unterschiede zwischen Gesunden und an Multiple Sklerose Erkrankten ergeben. Mittels Il- 2 Secretion Assay sollte eine Anreicherung der Zellen erreicht werden, die nach Stimulation mit MS-spezifischen Antigenen Il- 2 produzieren und somit für die inadäquate Immunantwort hauptverantwortlich sind.

Für die eingehende Analyse der Signaltransduktionskomponenten wird ein Modellsystem für zelluläre Autoimmunität benötigt. Es soll die Charakteristika der natürlichen MHC-TCR-Interaktionen reproduzieren können und gleichzeitig auch eine Differenzierung zwischen den Beiträgen des TCR und der kostimulatorischen Moleküle ermöglichen. Zu diesem Zweck sollten die Transfektanten der murinen BW58$\alpha^-\beta^-$ -Modellzelle etabliert werden. Die Modellzellen sind $CD4^+$ und transfiziert mit einem TCR eines Multiple Sklerose-

Patienten (spezifisch für MBP 139-51= BBC, für MBP 80- 99 = SS8). Die BBC-CD28-Modellzelle ist zusätzlich mit einem humanen CD28-Korezeptor transfiziert. Die Modellzellen können Il –2 produzieren. Um zu analysieren, ob sich die Charakteristika der humanen nativen T-Zellen auch bei den neuen Modellzellen nachweisen lassen, sollten zunächst ebenfalls die Expressionen der definierten Proteine bei verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht werden. Schließlich sollten funktionelle Untersuchungen mittels Calcium-Imaging das Modellsystem charakterisieren. Alle Ergebnisse sollten mit etablierten Modellsystemen verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien RPMI 1640 bzw. IMDM wurden von der Firma GibcoBRL, Eggenstein bezogen und vor der Verwendung mit folgenden Zusätzen komplementiert:

10 %	FCS (Fetal Calf Serum Gold)	PAA Laboratories, USA
100 IU/ml	Penicillin,	
100 µg/ml	Streptomycin,	
1 %	L-Glutamin (PSG)	GibcoBRL, Eggenstein

Folgende Zusätze wurden zur Selektion der Zelllinien eingesetzt:

1,5 mg/ml	G 418 (Geneticin, Na- Salz)	GibcoBRL, Eggenstein
300 µg/ml	Hygromycin B	Sigma, Deisenhofen
10 µg/ml	Puromycin	Sigma, Deisenhofen

Als Einfriermedium wurde 80 % FCS mit 20 % DMSO (Sigma) verwendet.

2.1.2. Untersuchungsmaterial

Die folgenden Modellzellen (Tabelle 4) und von ihnen abgeleitete Transfektanten wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 4 ▼: Verwendete Modellzellen.

Zellen	Beschreibung	Medium
Jurkat (ACC282) (DSMZ , Braunschweig)	humane akute T- Zell-Leukämie	RPMI- 1640 + FCS
BW58 $\alpha^-\beta^-$	murines T- Zell Hybridom/ Thymom	RPMI- 1640 + FCS + PSG
BBC	+ transfizierter α/β- T- Zell-rezeptor (spezifisch für das Epitop MBP 139- 151 in HLA- DR1/DR2a)	RPMI -1640 + FCS + PSG + G418 + Hygromycin

Zellen	Beschreibung	Medium
SS8	s. BBC (hier spezifisch für das Epitop MBP 80- 99 in HLA- DR2a)	s.BBC
BBC/CD28	BBC mit transfiziertem humanen CD28- Rezeptor	s. BBC + Puromycin
DR1	murine Fibroblasten mit HLA-DR1 (zur Präsentation von MBP 139- 151)	IMDM + FCS + PSG + G418

Die BW58α-β- Zelllinie besitzt keinen TCR, ist aber bereits transfiziert mit murinem CD4 (Letourneur 1989, Blank, 1993), aber nicht mit CD8. Eine TCRα– und TCRβ -cDNA wurde von einem CD4 positiven T- Zellklon eines MS-Patienten isoliert, in RSV5 Vektoren kloniert und in BW58α-β- transfiziert (Wiendl, 2002). Dadurch wird auch die Oberflächenexpression von CD3 wiederhergestellt, was mit Antikörpern gegen CD3 und Vβ9 des TCR bewiesen wurde. Auch konnte eine Il- 2 Produktion nach antiCD3- Stimulation die Funktionalität des TCR nachweisen (Wiendl, 2002).

Als murines und humanes Untersuchungsmaterial (Tabelle 5) dienten folgende Zellen:

Tabelle 5 ▼: Verwendete Zellen.

Zellen	Beschreibung	Medium
Murine Milzzellen	SJL- Maus	RPMI- 1640 + FCS
Humane Spenderzellen	Gesunde/MS- kranke Spender	RPMI- 1640

SJL- Mäuse wurden von Dr. Felix Bischoff zur Verfügung gestellt. Bei allen Arbeiten mit Mäusen wurden die Methodenempfehlungen der

Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden- Württemberg beachtet.
Die humanen Spenderzellen stammen von freiwilligen gesunden Spendern und von MS- Kranken.

2.1.3. Antikörper

FITC-α-mouse CD3ε	Pharmingen, Heidelberg
FITC-α-human CD3ε	Pharmingen, Heidelberg
FITC-α-human-CD28	Sigma, Deisenhofen
mIgG1 κ	Sigma, Deisenhofen
anti-DR1-Phycoerythrin	Pharmingen, Heidelberg

2.1.4. PCR- Primer

Syntethische Oligonukleotide wurden von der Firma GeneScan, Freiburg bezogen.

Tabelle 6 ▼: Verwendete Primer

Gene	Forward primer	Reverse primer
18S rRNA	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	GCT GGA ATT ACC GCG GCT
Fyn	CAG GCA GAA GAG TGG TAC TTT G	CTT TCA TAT CAT CCC AAT CAC G
Lck	TGG TGA AAC ATT ACA AGA TCC G	TCG GGG CTT CTG GGT CTG
ZAP-70	ACG GCA AGT TCC TGC TGA G	GCC AGA GCG TGT CAA ACT TG
Itk	CA TCT GCC TGG TGT TTG AG	GTA GGC CAT GCC CTC ACA C
Tec	AGA AAC AGC TTC ATC CAC AGA G	TAC CTG GCC ATTCCA AAA TC
PLCγ	CAG GAC TGG GTG AAA AAG ATC	CGT TCT GTG CCA ATC TTC TC
Vav	AGA TGA AGC TGG AGG AAT GTT C	GCT CCT GGA GAA GGA GGT G

2.1.5. Enzyme und Chemikalien

Acutase	GibcoBRL, Eggenstein
Dimethoxyoctadecylsilan	Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland
Ficoll	Seromed, Berlin
Fluo3/AM	TEF LABS, Austin Texas, USA
HBS- Puffer	Gibco, Invitrogen Corp
Ionomycin	Niche Chemical
MLV ReverseTranscriptase (200 u/µl)	Promega, USA
peqGOLD Trifast	peqLab, Erlangen, Germany
RNasin (40 u/µl)	Promega, USA
Sterile PBS DULBECCO´S	Gibco, Invitrogen Corp
Taq- Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau (Vitalfärbereagenz)	Sigma , Deisenhofen
5x M- MLV RT- Puffer	Promega, USA
100 bp Leiter	Gibco BRL, Eggenstein

2.1.6. Lösungen und Puffer

ACK- Puffer	150 mM NH_4Cl
	1 mM $KHCO_3$
	0,1 mM Na_2EDTA, pH 7,2
DNA- Auftragspuffer	0,1 % Orange G
	30 % Glycerol
	in 5 x TAE-Puffer oder H_2O_{dd}
FACS- Puffer:	0,1 % BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma Deisenhofen)
	0,1 % Na- Azid in PBS
Piranha- Lösung:	20ml H_2SO_4 konz., 30 ml 30 % H_2O_2
SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Freiburg)	
	hot- start- AmpliTaqGold, $MgCl_2$, dNTPs
	2 x SYBR Green PCR Puffer
TAE Puffer	40 mM Tris
	5 mM Na- Acetate

1 mM Na_2EDTA
bei pH 7,8

2.1.7. Geräte und sonstige Materialien

ABI PRISm 7700	Perkin Elmer, USA
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
FACS- Röhrchen	Becton Dickinson (Falcon), Heidelberg
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Laser- Scanning- Mikroskop, LSM 510	Zeiss, Jena
Neubauerzählkammer	Brand, Weinheim
Photometer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Vortex- Mischer	Scientific Industries, Zürich
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson (Falcon), Heidelberg
Zentrifugen: Laborzentrifuge	Hettich/ Rotanta, Osterode/Harz
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zellen

Um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen in Werkbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Es wurden nur γ- sterilisierte Zellkulturmaterialien und autoklavierte Pipettenspitzen verwendet.

Passagieren von Zellen

Die Suspensionszellen wurden stets bei Zelldichten zwischen 10^5/ml und 10^6/ml gehalten. In der Regel wurden die Zellen alle zwei Tage mit frischem Zellkulturmedium im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt.

Bei den adhärenten Zellen wurde alle zwei Tage das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für 20 ml- Flaschen wurde 1 ml Acutase zugegeben und die Flasche 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue, bereits mit Medium befüllte Flasche transferiert.

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO_2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung von Zellzahl und Lebendzahl wurde einer frisch suspendierten Kultur ein Aliquot entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in tote, nicht aber in lebende Zellen ein, wodruch diese voneinander unterschieden werden können. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer- Zählkammer gegeben. Die Zahl ungefärbter Zellen in zwei Großquadranten der Zählkammer multipliziert mit dem Kammerfaktor 10^4 ergab die Zellzahl pro ml der Kultur.

Einfrieren und Auftauen

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden geerntet und zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in 1 ml kaltem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen transferiert, das dann in Eis gekühlt wurde. Nach der Zugabe von 1 ml Einfriermedium (80% FCS + 20 % DMSO) wurden die Zellen zügig bei –80°C eingefroren. 24 h später konnten die Zellen zur Dauerkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Vor dem Auftauen wurden 5 ml Zellkulturmedium in eine 25 cm^2- Zellkulturflasche und 3 ml in ein 5 ml- Röhrchen vorgelegt und auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden zügig aufgetaut und in das 5 ml- Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit 2 ml Medium in die Zellkulturflasche transferiert.

2.2.2. Isolierung von Mausmilz- Zellen zur ex vivo Analyse

SJL- Mäuse wurden von Dr. Felix Bischoff zur Verfügung gestellt. Die Milz wurde nach Tötung durch Genickbruch entnommen. Zur Vereinzelung der Zellen wurden diese durch ein steriles Teesieb gedrückt. Nach Zentrifugation (1800 rpm, 2 Minuten) wurden die Zellen zur Lyse von Erythrozyten in 5 ml ACK- Puffer für 8 Minuten resuspendiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1300 rpm, 5 Minuten) und in RPMI- 1640 aufgenommen.

2.2.3. Isolierung von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zur ex vivo Analyse

Es wurden PBMCs aus EDTA- Blut von freiwilligen, gesunden Spendern und von MS- kranken isoliert.

Das Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt. 15 ml Ficoll wurden in einem 50 ml Falcon Tube mit 35 ml des Blut- Ficoll- Gemisches langsam überschichtet. Anschließend wurde bei 1800 rpm 20 Minuten bei RT ohne Bremse zentrifugiert; um den Gradienten nicht zu zerstören. Dann wurden von oben ca. 10 ml vorsichtig abgenommen, um die Thrombozytenzahl zu reduzieren.

Danach folgte der zweite Zentrifugationsschritt (1800 rpm, 25 min, RT, ohne Bremse). Jetzt konnten die PBMCs in der Interphase geerntet werden. Nach 2maligem Waschen mit PBS (1500 rpm 10 min,4°C) wurde das Pellet in Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauerkammer bestimmt.

2.2.4. Stimulation von T- Zellen

Eine 96 Well- Platte wurde über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern (Tabelle 7) bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden danach in einer Konzentration von 10^6/ml (100 µl/well) auf der beschichteten Versuchsplatte verteilt, dann nach entsprechender Inkubationszeit abpipettiert (Tabelle 7), für die RNA-Isolation in 500 µl Trifast aufgenommen und bei –80° eingefroren.
Für die physiologische Stimulation der BBC- Zellen wurde eine 96 Well- Platte über Nacht im Brutschrank zunächst mit den DR1- Zellen inkubiert (35.000 Zellen/well). Danach wurden 10 µl MBP 139- 151 (1 mg/ml) pro well zugegeben. Der Überstand wurde nach 6 h Inkubation im Brutschrank abgenommen. Dann wurden die BBC- Zellen in einer Konzentration von 10^6/ml (100 µl/well) auf die Versuchsplatte gegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit (Tabelle 7) wurden die BBC- Zellen vorsichtig abpipettiert, in 500 µl Trifast aufgenommen und ebenfalls bei –80 °C eingefroren.

▼ **Tabelle 7**: Stimulationsbedingungen der verwendeten Modellzellen und anderer Untersuchungsmaterialien für die T- Zell- Stimulation.

Zellen	Stimulation mit	Dauer
Modellzellen		
Jurkat ACC282	1. antiCD3ε (anti- human)	6 h, 12 h, 24 h
	2. antiCD3ε und antiCD28 (anti- human)	6 h, 12 h, 24 h
BBC	1. antiCD3ε (anti- murin)	6 h, 12 h, 24 h
	2. DR1-Zellen/ MBP139-151 (physiologische Stimulation)	6 h, 12 h, 24 h
SS8	antiCD3ε (anti- murin)	6 h, 12 h, 24 h
BBC/CD28	1. antiCD3ε (anti- murin)	6 h, 12 h, 24 h
	2. antiCD3ε (anti- murin) und antiCD28 (anti- human)	6 h, 12 h, 24 h
murine Milzzellen	antiCD3ε (anti- murin)	6 h, 12 h, 24 h
humane Spenderzellen		
Gesunde Spender	1. antiCD3ε (anti- human)	jeweils 24 h
	2. COP	
MS-Kranke Spender	1. antiCD3ε (anti- human)	jeweils 24 h
	2. COP	

2.2.5. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)/ Durchflußzytometrie

Die Expression von Zelloberflächenproteinen wurde durch Färbung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Messung im FACScan bestimmt.

Pro Ansatz wurden $2x10^5$ Zellen in 90 µl FACS- Puffer mit jeweils 10 µl FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern (mAb) versehen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit FITC-α-mouse CD3ε (Verdünnung 1:10) bzw. FITC-α-human CD3ε (Verdünnung 1:10) und FITC-α-human-CD28 (Verdünnung 1:10). In

beiden Fällen dienten Isotyp- identische IgG- mAb (Verdünnung 1:10) als Kontrollen. Die Zellen wurden für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 150 µl FACS- Puffer gewaschen und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 100 µl FACS- Puffer resuspendiert.
Pro Ansatz gingen 10 000 Ereignisse in die Wertung ein. Es wurde mit CellQuest ausgewertet. Die Darstellung und Auswertung der Meßdaten erfolgte mit Hilfe von dot- plot und Histogramm- Schaubildern.

2.2.6. Calcium- Imaging

2.2.6.1. Konfokale Laser- Scanning- Mikroskopie

Ein konventionelles Lichtmikroskop bestrahlt das gesamte Gesichtsfeld der Probe. Ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (bestehend aus den drei Modulen: Scanning Modul, Lasermodul, Mikroskop, Abb. 4) bestrahlt hingegen nur punktuell. Ebenso punktuell wird die Fluoreszenz detektiert, die der Laser hervorruft. Ein Bild mit mikroskopischer Auflösung wird über die gesamte Probe mittels eines Rechners auf der Grundlage der seriellen, punktuellen Messungen erstellt (Punktscanner). Die entscheidende Besonderheit des LSM gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop ist die konfokale Blende (Pinhole). Sie ist in einer zur Zwischenbildebene und damit zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet (Abb. 4). Der Photomultiplier detektiert daher nur Licht, dass diese Blende passiert. Der Durchmesser der Blende ist variabel und im Idealfall punktförmig. Da der beugungsbegrenzt fokussierte Lichstrahl einer punktförmigen Beleuchtung des Objekts entspricht und des weiteren Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden, spricht man von einem konfokalen Strahlengang. Der Durchmesser der konfokalen Blende legt fest, in welchem Maße Licht außerhalb der Fokusebene detektiert wird. Da die ausgeblendeten Bereiche unter und oberhalb der Objektebene nicht detektiert werden, ist das optische System des konfokalen Mikroskops inhärent tiefendiskriminierend. Bei geöffneter Blende wird nicht-konfokal mikroskopiert, bei geschlossener konfokal. Die Konfokalität

hat dabei den zusätzlichen positiven Effekt einer Streulichtunterdrückung und somit einer gesteigerten Kontrastierung der Probe.

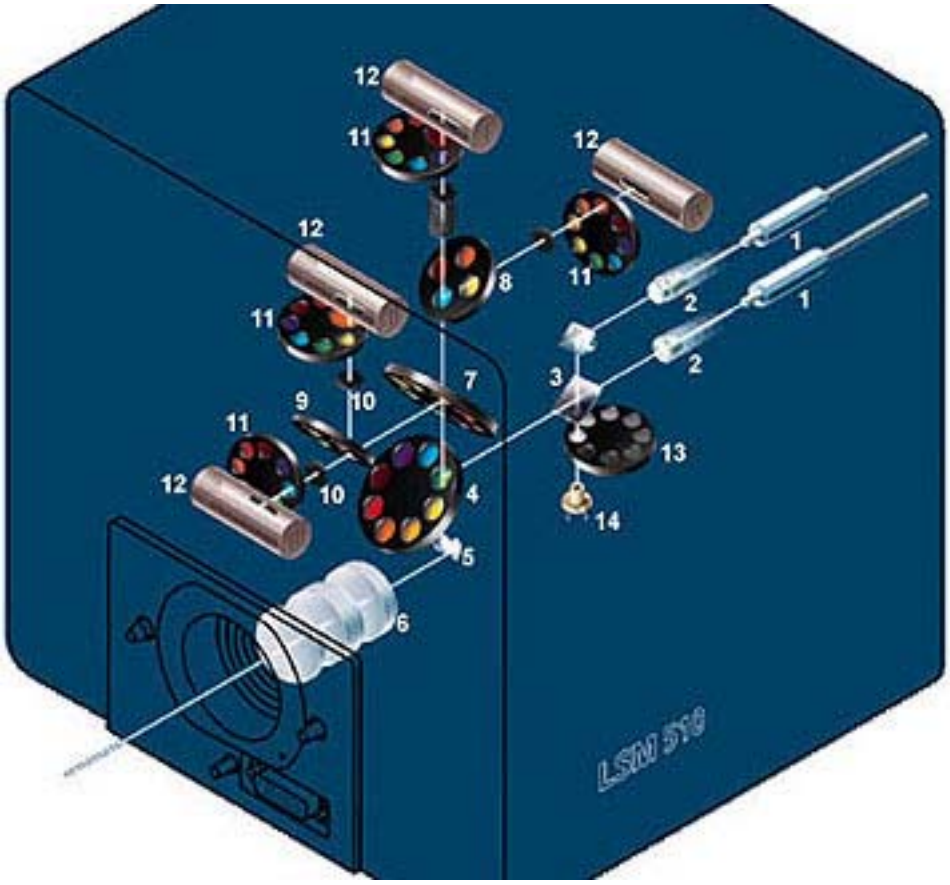

Abb. 4 ▲: Strahlengang im Scan Modul des LSM510 (Zeiss, 2000)
Aus den Lasermodulen gelangen die Laserstrahlen, die die Fluoreszenz im Präparat anregen sollen, durch Lichtleiter (1) zum Scan Modul. Nach Passieren der Kollimatoren (2) werden die Laserstrahlen werden vereinigt (3) und vom **Hauptfarbteiler (4)** zum **Scanner (5)** reflektiert. Die Scanoptik (6), die Mikroskopoptik und die Scannerspiegel führen die Lichtstrahl als beugungsbegrenzten Lichtpunkt durch das Präparat.
Das vom Präparat zurückkommende Fluoreszenz- und Reflexionslicht passiert wiederum den **Hauptfarbteiler (4)**, um dann auf den Photomultiplier (Detektor) projeziert zu werden. Dabei kann es über drei Nebenfarbteiler (7,8,9) spektral aufgespalten werden. Eine **Lochblende (10)** ist vor jedem **Photomultiplier (12)** angebracht. Die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts wird durch die **Emissionsfiter (11)** selektioniert. Blocken, die auch dazu dienen, den Anregungslaser zu blocken. 13, 14 bestimmen die Laserleistung.

2.2.6.2. Versuchsdurchführung

Hydrophobisierung der Deckgläschen

Zuerst wurden die Dioxidbrücken des SiO_2 zu OH- Gruppen hydrolysiert. Dazu wurden die Deckgläschen 2 h mit 1 M NaOH behandelt. Nach Waschen mit H_2O_{dd} und Abtrocknen im Luftstrom wurden die Deckgläschen mit Piranha-

Lösung 30- 45 Minuten in einer Dünnschichtchromatographiekammer gereinigt. Zur Silanisierung wurden die Deckgläschen vorerst mit H_2O_{dd} abgespült, dann getrocknet und schließlich über Nacht bei RT mit Dimethoxyoctadecylsilan inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen bis zur optimalen sichtbaren Reinheit mit Toluol abgespült und abgetrocknet.

Zellvorbereitung und Stimulation

Die hydrophobisierten Deckgläschen wurden entweder mit 5 µg/ml αCD3ε oder mit einer Mischung aus αCD3ε/αCD28 in PBS für 2 h inkubiert. Für das Calcium- Imaging wurden die Zellen dann in PBS aufgenommen. Der Calcium-Farbstoff Fluo3/AM in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in einer Endkonzentration von 5 µM hinzugefügt. Fluo 3/AM (Acetoxymetyl) ist in der Esterform membrangängig und wird nach Eindringen in die Zelle während der Inkubation durch endogene Esterasen hydrolysiert. Dadurch kann Ca^{2+} binden, und Fluoreszenz (~ 525nm) kann im Laser Scanning Mikroskop (LSM, Argon-Ionen Laser 488nm) nachgewiesen werden. Nach 40 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in HBS (zu 1 x 10^6 Zellen/ml) aufgenommen. Danach wurden die Zellen auf die ebenfalls zweimal mit PBS gewaschenen behandelten Deckgläschen, die zuvor in einer Mikroskopierkammer plaziert worden waren, gegeben und sofort mikroskopiert.

Mikroskopie

Das Calcium Signal wurde mittels konfokaler Laser- Scanning- Mikroskopie gemessen. (LSM 510 mit einem C- Apochromat 63 x 1.2W Objektiv für die nichtkonfokale Einstellung). Zuerst wurde der Fokus auf den Deckgläschengrund scharf gestellt und dann wurden die Zellen so hinzugefügt, dass sich eine Endkonzentration von 5 x 10^5/ml in 0,5 ml Endvolumen ergab. Es wurde eine Zeitserie über 10min aufgenommen, bei der alle 10 Sekunden eine Bildaufnahme erfolgte.

Als Negativkontrolle diente ein nur mit PBS inkubiertes Deckgläschen, als Positivkontrolle eine Probe, zu der das Calciumsalz Ionomycin unter

Mikroskopkontrolle gegeben wurde. Ionomycin ist lipidlöslich und transportiert Ca^{2+} durch biologische Membranen.

2.2.7. Il- 2 Secretion Assay

Beim Il- 2 Secretion Assay werden genau die Zellen in der Probe angereichert, die durch die Stimulation mit einem bestimmten Peptid oder Protein Il- 2 produzieren. Der Assay wurde von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, bezogen. Für die Analyse wurden PBMCs von gesunden und MS-kranken Spendern 6 h (bei 37 °C, 7 % CO_2 in RPMI- 1640- Medium mit 20 % humanem Serum) mit MBP restimuliert (10 μg/ml). Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Probe nicht stimuliert, als Positivkontrolle eine Probe mit SEB. Das Versuchsprotokoll wurde nach Anleitung der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt (www.miltenyibiotec.com). Zunächst wurde ein Il- 2 spezifisches „Catch Reagent“ zugefügt (anti- Il- 2 monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) konjugiert an einen für die Oberfläche der Leukozyten spezifischen monoklonalen Antikörper (Maus IgG2a)). Nach der Bindung des Antikörpers an die Oberfläche der PBMCs wurden die Zellen bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert, um die Zytokinproduktion stattfinden zu lassen. Das sezernierte Il- 2 bindet an den „Il- 2 Catch Reagent“ auf den positiven Zellen. Diese Zellen konnten dann mit einem zweiten Antikörper für die FACS- Analyse vor der Anreicherung markiert werden (anti- Il- 2 monoklonaler Antikörper (Maus IgG2a), konjugiert an Phycoerythrin, PE). Durch Bindung an Anti- PE MicroBeads (kolloidale superparamagnetische MicroBeads konjugiert an monoklonale anti- PE Antikörper (Maus IgG1)) konnten nun die Il- 2 sezernierenden Zellen durch eine MACS- Säule (magnetic- associated cell sorting), die in einem magnetischen Feld plaziert wurde, angereichert werden. Hierbei wurden die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten. Durch Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld wurden die Il- 2 produzierenden Zellen herausgelöst und konnten für Analysen, insbesondere für die FACS- Analyse nach der Anreicherung, weiterverwendet werden.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Primerdesign: Human- murine- Oligonucleotid Primer

Für die relative Quantifizierung spezifischer RNA mittels ABI PRISM Sequence Detection System wurden Primer erstellt, die interspezifisch für Maus und Mensch sind (Tabelle 6). Die jeweiligen DNA- Sequenzen für die vorher definierten Signaltransduktionsproteine fanden sich in der Datenbank des EMBL- EBI/Sanger Institutes (unter http://www.ensembl.org). Das Programm T-Toffee (unter http://ch.embnet.org) diente zur Überprüfung der Übereinstimmung zwischen Sequenzen von Maus und Mensch. Dabei wurden die beiden Sequenzen genau aneinander gelegt und jede einzelne Base sowie die Exon- Exon- Grenzen miteinander verglichen. Dann konnten Primer von genau übereinstimmenden Regionen der entsprechenden Sequenz entworfen werden, um möglichst gleiche Bedingungen bei der Amplifizierung der Proteine der verschiedenden Spezies zu gewährleisten. Mit HUSAR (http://genius.dkfz-heidelberg.de) wurden die Primer schließlich erstellt. Sie wurden wenn möglich über Exon- Exon- Grenzen gelegt, oder wenn dies nicht möglich war, in zwei verschiedene Exons, um nicht genomische DNA zu vervielfältigen. Um die Effizienz der PCR- Amplifizierung zu erhöhen wurden die Ampliconlängen auf <150bp begrenzt. Jedes Primer- Paar wurde mit der Datenbank Nucleotide Blast (unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) auf unspezifische humane und murine Interaktionen getestet. Mittels konventioneller RT- PCR und real- time RT- PCR – wie im folgenden beschrieben - wurden sie validiert.

2.3.2. RNA- Isolierung

Zuerst wurden die Zellen in 1 ml peqGOLD Trifast aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl und 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 Sekunden per Hand geschüttelt, 2- 3 Minuten bei RT inkubiert und dann bei 13.000 U/min und 2- 8 °C 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde in ein RNase freies Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zusatz von 0,5 ml Isopropanol wurde 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend bei 13.000

U/min und 2- 8 °C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen. Dann wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und die RNA in 22,5 µl DEPC- Wasser (RNase- frei) gelöst und 10 Minuten bei 55- 60 °C inkubiert.
Die Reinheit und die Konzentration der gelösten RNA wurde durch Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt, die extrahierte RNA bei –80 °C gelagert.

2.3.3. cDNA- Synthese (RT- Reaktion)

2,5 µg RNA wurden pro RT- Reaktion eingesetzt (gelöst in 21,5 µl DEPC-Wasser). Bevor bei 70 °C 10 Minuten inkubiert wurde, mußten 2 µl zufällige Hexamere (200 ng/µl) hinzugefügt werden. Sofort danach folgte eine Kühlung auf Eis.

1 x RT Ansatz:	5 x M- MLV RT-Puffer	10,00 µl
	dNTPs (10 mM)	10,00 µl
	Rnasin (40 u/µl)	0,25 µl
	M- MLV RT (200 u/µl)	1,00 µl
	DEPC- Wasser	5,25 µl

26,5 µl des Reaktionsansatzes wurden zur RNA/Hexamer- Lösung gegeben. Die Proben wurden gemischt und 10 Minuten bei RT, dann 50 Minuten bei 42 °C und schließlich 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die cDNA- Lösung wurde bei –20 °C gelagert.

2.3.4. Konventionelle RT- PCR

Jeweils 1 µl der cDNA- Proben (2.3.3.) wurde auf Eis vorgelegt und mit folgendem Reaktionsansatz versehen:

1 x Ansatz:	DEPC- Wasser	13,3 µl
	10 x PCR- Puffer	2,0 µl
	dNTPs	1,6 µl
	10µM FORWARD- Primer	1,0 µl
	10µM REVERSE- Primer	1,0 µl
	Taq- Polymerase	0,2 µl

Danach wurde die PCR- Reaktion im Thermocycler gestartet (95 °C 1 Minuten Denaturierung, 50 °C 1 Minuten Hybridisierung, 70 °C 2 Minuten Amplifizierung, 40 Zyklen).
Zur Analyse der PCR- Produkte wurden diese auf 2 %iges Agarosegel (TAE-Puffer, 1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und mit einem DNA-Längenstandard (100 bp Leiter) verglichen. Die Proben wurden dafür mit 1/3 Volumenanteil DNA- Auftragspuffer versetzt. Danach wurde die Elektrophorese 40 Min bei 75 mA durchgeführt. In Anwesenheit von Ethidiumbromid ließ sich die DNA im UV- Licht sichtbar machen und mit Hilfe einer Videokamera photographieren.

2.3.5. Relative Quantifizierung der Gen- Expression durch real- time RT-PCR Analyse

Die Amplifizierung der generierten cDNA wurde mit dem Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix in ABI PRISm 7700 von Perkin Elmer durchgeführt (Temperatur- Profil: 2 Minuten 50 °C, 10 Minuten 95 °C und 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C für die Denaturierung und 1 Minute bei 60 °C für die Hybridisierung und Amplifizierung).
Die Fluoreszenz des SYBR Green Farbstoffes, der nur an doppelsträngige DNA bindet, wurde direkt im Reaktionsröhrchen gemessen. Die Fluoreszenz ist proportional zur PCR- Produktmenge, die gebildet wird.
Am Ct- threshold- Zyklus passiert die Fluoreszenzintensität eine festgelegte Schwelle (exponentielle Phase). Dies macht die Ct- Werte sehr gut reproduzierbar.

Reaktionsvolumen 15 µl: 5 µl cDNA (~2,5 ng RNA),
7,5 µl Master Mix,
0,9 µl FORWARD- Primer, 0,9 µl REV- Primer,
0,7 µl DEPC- Wasser.

Die Daten wurden mittels der vergleichenden Ct- Methode analysiert (PE-Applied Biosystems, User Bulletin 2, S.11-15, 12.11.97). Alle Ct- Werte wurden auf eine endogene Kontrolle (18S RNA) bezogen, um möglichen unterschiedlichen RNA- Anfangskonzentrationen Rechnung zu tragen. Alle Ergebnisse wurden relativ zu einer der Proben dargestellt. Alle Proben wurden doppelt getestet und als Mittelwert verrechnet, sowie zwei Proben ohne cDNA aufgetragen. Außerdem wurde die Produktspezifität anhand der Dissoziationskurve überprüft.

2.4. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte deskriptiv, p-Werte unter 5% wurden als statistisch auffällig betrachtet.
Die Basiswerte (t= 0) der Versuche bei den Modellzellen wurden mit Hilfe des Dunnett- Tests auf statistische Auffälligkeit hin untersucht. Die Ergebnisse der Stimulationen (6, 12, 24 Stunden mit antiCD3, antiCD28, MBP) wurden anhand des repräsentativen Versuchs Nr. 2 (von 3) beschrieben.
Zur statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse der humanen Zellen diente der parameterfreie Mann- Whitney- Wilcoxon-Test, da den Daten eine Normalverteilung nicht zu unterstellen war. Die Effekte der Stimulationsversuche (24- Stunden Stimulation mit antiCD3 oder Cop) wurden durch die Differenzen zwischen dem 24- Stunden- und dem Basiswert (t= 0) berechnet und den entsprechenden statistischen Vergleichen zugeführt. Zur Berechnung von Wechselwirkungen zwischen den beiden Stimulationen wurde ebenfalls der Mann- Whitney- Wilcoxon- Test eingesetzt.
Alle Auswertungen erfolgten mit dem Statistikpaket SAS 9.1.3 und wurden am Institut für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Design und Etablierung interspezifische Primer

3.1.1. Interspezifisches Primerdesign wichtiger T-Zell-Signal-transduktionsproteine für die Autoimmunität und Calcium-Freisetzung

In zahlreichen Arbeiten wurden bestimmte T-Zell-Signaltransduktionsproteine für die Entstehung von Immundefekten und Autoimmunität verantwortlich gemacht (Grunebaum and Roifman, 2001; Ohashi, 2002; Salojin et al., 1997). Es wurden deshalb wichtige Proteine der T-Zell-Signaltransduktion ausgewählt, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunität stehen könnten und gleichzeitig eine Schlüsselrolle bei der Calciumfreisetzung spielen. Die Proteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ, Itk und Vav wurden analysiert. Um die Vergleichbarkeit zwischen humanen nativen T-Zellen und verschiedenen murinen und humanen Modellsystemen zu ermöglichen, wurden interspezifische Primer für die definierten Signaltransduktionsproteine generiert (Tabelle 4). Die jeweiligen DNA-Sequenzen der beiden Spezies wurden im Programm T-Toffee (unter http://ch.embnet.org) genau aneinander gelegt und jede einzelne Base sowie die Exon-Exon-Grenzen miteinander verglichen (Abb.9 A-G). Mit HUSAR (http://genius.dkfz-heidelberg.de) konnten die Primer dann in genau übereinstimmenden Regionen erstellt werden. Sie wurden wenn möglich über Exon-Exon-Grenzen gelegt. Die Produktlänge sollte weniger als 150bp betragen. Jedes Primer-Paar wurde mit der Datenbank Nucleotide Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) auf unspezifische humane und murine Interaktionen getestet. Forward und Reverse Primer wurden auf gleiche Schmelztemperatur eingestellt.

A

Fyn forward primer: 5´-CAG GCA GAA GAG TGG TAC TTT G- 3´

reverse primer: 5´-CTT TCA TAT CAT CCC AAT CAC G- 3´

```
Acc.No.  human:  M14333
         murin:  M27266
                          | forward primer                 |
                 5´          658   Exon 4 ←      → Exon 5
human:   TTGACTCTATCCAGGCAGAAGA|GTGGTACTTTGGAAAACTTGGCCGAAAAGATGC
murin:   TTGACTCCATCCAGGCAGAAGA|GTGGTACTTTGGAAAACTTGGCCGCAAAGATGC
                          Exon 3 ←      → Exon 4
Konsens  +++++++_++++++++++++++++++++++++++++++++++ _++++++++

human:   TGAGCGACAGCTATTGTCCTTTGGAAACCCAAGAGGTACCTTTCTTATCCGCGAGA
murin:   TGAGAGACAGCTCCTGTCCTTTGGAAACCCAAGAGGTACCTTTCTTATCCGCGAGA
Konsens  ++++_+++++++__++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++

                          Exon 5 ←      → Exon 6                | reverse primer
human:   GTGAAACCACCAAAG|GTGCCTATTCACTTTCTATCCGTGATTGGGATGATATGAA
murin:   GCGAAACCACCAAAG|GTGCCTACTCACTTTCCATCCGTGATTGGGATGATATGAA
                          Exon 4 ←      → Exon 5
Konsens  +_++++++++++++++++++++_++++++++_++++++++++++++++++++++++

                   |          3´
human:   AGGAGACCAT
murin:   AGGGGACCAC
Konsens  +++_ +++++ _
```

Produktlänge: 109bp

B

Lck forward primer: 5´-TGG TGA AAC ATT ACA AGA TCC G- 3´

reverse primer: 5´-TCG GGG CTT CTG GGT CTG- 3´

```
Acc.No.  human:  P01389
         murin:  X03533
                          | forward primer                 |
                 5´          723
human:   ACCAGGGAGAGGTGGTGAAACATTACAAGATCCGTAATCTGGACAACGGTGGCTT
murin:   ACCAGGGAGAAGTGGTGAAACATTACAAGATCCGTAACCTAGACAACGGTGGCTT
Konsens  ++++++++++ _ ++++++++++++++++++++++++++ _++ _+++++++++++++

human:   CTACATCTCCCCTCGAATCACTTTTCCCGGCCTGCATGAACTGGTCCGCCATTACAC
murin:   CTACATCTCCCCTCGTATCACTTTTCCCGGATTGCACGATCTAGTCCGCCATTACAC
Konsens  ++++++++++++++++_++++++++++++++__++++_++_++_++++++++++++++

         ← →Exon 7/8                                          | reverse primer
human:   CA|ATGCTTCAGATGGGCTGTGCACACGGTTGAGCCGCCCCTGCCAGACCCAGAAG
murin:   CA|ACGCCTCTGATGGGCTGTGCACAAAGTTGAGCCGTCCTTGCCAGACCCAGAAG
Konsens  +++ +_ ++ _++_+++++++++++++++ __+++++++++_++_+++++++++++++++
         ← →Exon 6/7

                   |          3´
human:   CCCCGAAAGCCGTGGTGG
murin:   CCCCGAAAACCATGGTGG
Konsens  +++++++++_++_++++++
```

Produktlänge: 120bp

C

ZAP-70

forward primer: 5´- ACG GCA AGT TCC TGC TGA G –3´

reverse primer: 5´- GCC AGA GCG TGT CAA ACT TG –3´

```
Acc.No.: human:  L05148
         murin:  U04379
                                  | forward primer          |
                 5´          659     Exon 4 ←      → Exon 5
human:   GGGCGCAGACCGACGGCAAGTTCCT|GCTGAGGCCGCGGAAGGAGCAGGGCACAT
murin::  GCCAGCAGACCGACGGCAAGTTCCT|GCTGAGGCCCCGGAAGGAGCAGGGCACAT
                                  Exon 2 ←      → Exon 3
Konsens  + ____ ++++++++++++++++++++ +++++++++ _ ++++++++++++++++++

human:   ACGCCCTGTCCCTCATCTATGGGAAGACGGTGTACCACTACCTCATCAGCCAAGAC
murin:   ATGCACTGTCCCTGGTCTATGGGAAAACTGTATACCACTATCTCATCAGCCAGGAC
Konsens  +_++_++++++++__++++++++++ _ ++ _++_++++++++_ ++++++++++_ +++

                                                  | reverse primer |
                                                                 808  3´
human:   AAGGCGGGCAAGTACTGCATTCCCGAGGGCACCAAGTTTGACACGCTCTGGCAG|C
murin:   AAGGCTGGCAAGTACTGCATCCCCGAAGGCACCAAGTTTGACACGCTCTGGCAG|C
Konsens  +++++_ ++++++++++++++_ +++++ _ ++++++++++++++++++++++++++ +
```

Produktlänge: 110bp

D

Tec forward primer: 5´- AGA AAC AGC TTC ATC CAC AGA G –3´

reverse primer: 5´- TAC CTG GCC ATTCCA AAA TC –3´

```
Acc.No.  human:  D29767
         murin:  S53716
                                | forward primer          |
                 5´         1555                  Exon 13 ←      → Exon 14
human:   GAGTATCTGGAGAGAAACAGCTTCATCCACAGAGATCTG|GCTGCCAGAAATTGCT
murin:   GAGTACCTGGAGAGAAACAGCTTCATCCACAGAGACCTG|GCTGCCAGAAATTGTC
                                                 Exon 12 ←      → Exon 13
Konsens  +++++_ ++++++++++++++++++++++++++++ +_ +++ +++++++++++++++ _
                                                  | reverse primer |
                                                                 1649  3´
                                                          ←Exon 13   Exon 14 →
human:   TAGTAAGTGAGGCGGGAGTTGTAAAAGTATCTGATTTTGGAATGGCCAG|GTATGT
murin:   TAGTGAATGAAGCAGGAGTTGTCAAAGTATCTGATTTTGGAATGGCCAG|GTACGT
                                                          ←Exon 13   Exon 14 →
Konsens  ++++_+_ +++_++ _ ++++++++_ +++++++++ ++++++++++++++++ +++ _++
```

Produktlänge: 53bp

E

PLCγ forward primer: 5´-CAG GAC TGG GTG AAA AAG ATC –3´

reverse primer: 5´-CGT TCT GTG CCA ATC TTC TC–3´

```
Acc.No.  human:  P19174
         murin:  X95346
                          | forward primer            |
                 5´      223                                          ← Exon 4   Exon 5 →
         human:  GAGCTGCAGGACTGGGTGAAAAAGATCCGTGAAGTGGCCCAGACAGCAG|CTCA
         murin:  GAGTTACAGGACTGGGTGAAAAAGATCCGTGAAGT TGCCCAGACTGCAG|CTCA
                                                                   ← Exon 3   Exon 4 →
         Konsens +++ _+_ ++++++++++++++++++++ ++++++++ _ ++++++++ _++++ ++++

         human:  CTGAAGGGAAGATAATGGAACGGAGGAAGAAGATTGCCCTGGAGCTC TCTGAA
         murin:  CTGAGGGAAAGATGATGGAGAGGAGGAAGAAGATCGCCTTGGAGCTCTCCGAG
         Konsens ++++ _ ++_ +++++_ +++++ __ ++++++++++++ _+++ _++++++++++_++ _

                                                        | reverse primer
                                                 Exon 5 ←      → Exon 6
         human:  CTTGTCGTCTACTGCCGGCCTGTTCCCTTTGATGAAGAGA|AGATTGGCACAGAA
         murin:  CTTGTGGTCTACTGCCGGCCCGTTCCCTTTGATGAAGAGA|AGATTGGCACAGAA
                                                   Exon 4 ←      → Exon 5
         Konsens ++++ _ ++++++++++++++ _ ++++++++++++++++++ ++++++++++++++

                   386    3´
         human:  CGTGCTTG
         murin:  CGTGCTTG
         Konsens ++++++++
```

Produktlänge: 122bp

F

Vav forward primer: 5´- AGA TGA AGC TGG AGG AAT GTT C –3´

reverse primer: 5´- GCT CCT GGA GAA GGA GGT G –3´

```
Acc.No.  human:  P15498
         murin:  P27870
                                                | forward primer              |
                 5´                          927      Exon 9 ←      → Exon 10
         human:  GCCGCAGCCCGGGAGGACGTGCAGATGAAGCTGGAG|GAATGTTCTCAGAGAG
         murin:  GCCACAGCACGGGAGGATGTGCAGATGAAGCTGGAG|GAATGTTCTCAAAGAG
                                                   Exon 8 ←      → Exon 9
         Konsens +++ _++++_++++++++ _ ++++++++++++++++++ ++++++++++_ ++++

         human:  CCAACAACGGGAGGTTCACCCTGCGGGACCTGCTGATGGTGCCTATGCAGCGA
         murin:  CTAACAATGGCCGATTCACCCTACGGGATCTGC TGATGGTACCTATGCAGCGG
         Konsens +_ +++++_++ __ +_ ++++++++ _+++++ _++++++++++ _++++++++++ _

                                        | reverse primer          |
                                  Exon 10 ←      → Exon 11   1040    3´
         human:  GTTCTCAAATA T CACCTCCTTCTCCAG|GAGCTGGTGAAACACA
         murin:  GTGCTGAAGTAC CACCTCCTTCTCCAG|GAGCTAGTGAAACACA
                                        Exon 9  ←      → Exon 10
         Konsens ++ _++_++ _ ++_ ++++++++++++++ +++++ _++++++++++
```

Produktlänge: 72bp

G

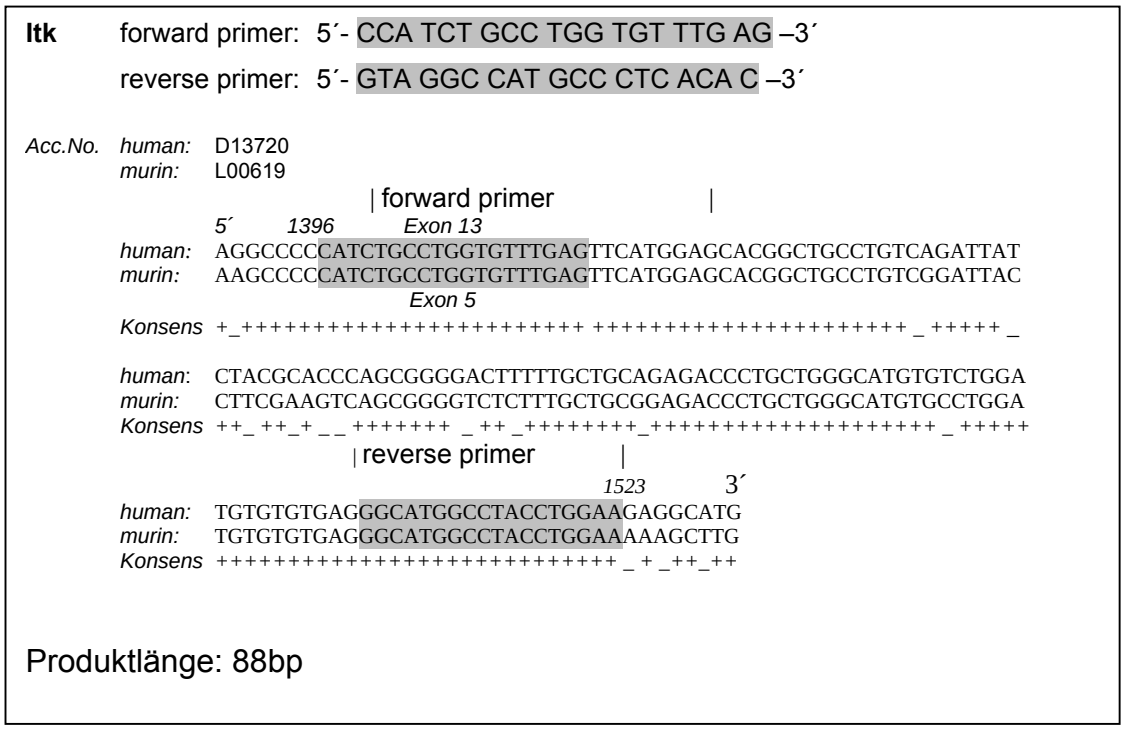

Abb.9: Sequenzen mit Homologie und Bindungsstellen der interspezifischen Primer im jeweils humanen und murinen Gen. Die DNA-Sequenzen der jeweiligen Signaltransduktionsproteine beider Spezies wurden im Programm T-Toffee (http://ch.embnet.org) genau aneinander gelegt und die Übereinstimmung überprüft. Mit HUSAR (http://genius.dkfz-heidelberg.de) konnten die Primer dann in genau übereinstimmenden Regionen erstellt werden. Die Produktlänge betrug weniger als 150bp. Sie wurden über Exon-Exon-Grenzen gelegt. **A-G** Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ, Vav, Itk.

3.1.2. Validierung der Primer in der konventionellen RT-PCR

Um die interspezifischen Primer für die real-time PCR zu validieren, wurden diese zunächst in der konventionellen RT-PCR für die verschiedenen Modellzellen getestet.

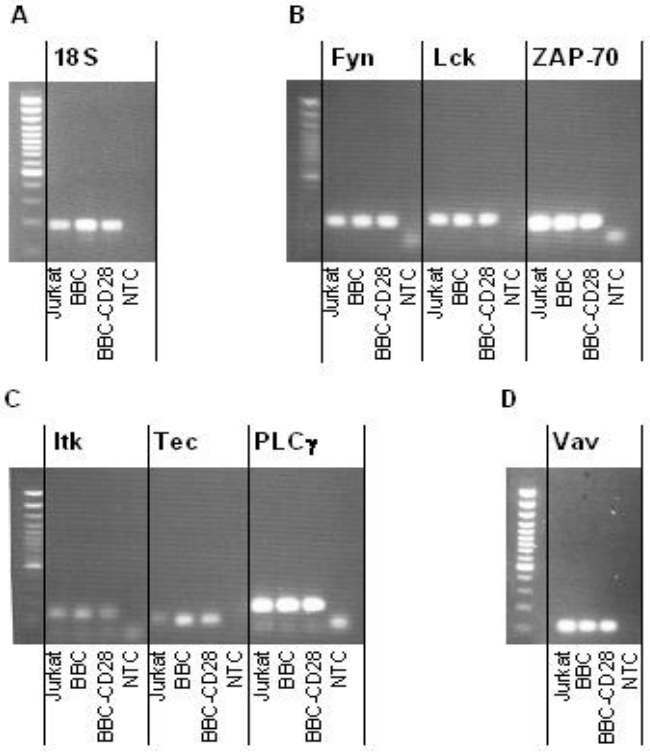

Abb.10 : Charakterisierung der Modellzellen sowie Etablierung der human-murinen Primer. Die RNA-Expression der Signaltransduktionsproteine wurde durch konventionelle RT-PCR getestet. Dargestellt sind jeweils die Expression bei Jurkat, BBC und BBC-CD28 sowie die NTC (no template control). **A** 18S. **B** Fyn, Lck und ZAP-70. **C** Itk, Tec und PLC. **D** Vav.

Die Genexpression der untersuchten Signaltransduktionsproteine war bei allen Modellzellen durch konventionelle RT-PCR eindeutig nachweisbar. Die interspezifischen Primer erbrachten bei den Modellzellen die richtige Produktlänge und keine Zusatzbanden (Abb.10).

3.2. Vergleichende Expressionsanalysen in humanen T-Zellen gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender

3.2.1. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten primären humanen T-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich bei den definierten Signaltransduktionsproteinen Unterschiede zwischen gesunden und MS-kranken Spendern finden, wurden PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern und von MS-Kranken isoliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real-time RT-PCR ermittelt (Abb.13, Tabelle 6).

Bei den T-Zellen von erkrankten Spendern (n=10) war ZAP-70 2,5 fach und Vav 3,5 fach höher exprimiert (jeweils Median) als bei gesunden Spendern (n=10). Lck und PLCγ waren bei den Gesunden 2fach höher exprimiert. (Abb.13). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch auffällig (Wilcoxon Test, p>0,05, Tabelle 6).

Tabelle 6 ▼: Vergleich der mRNA-Expression der Signaltransduktionsproteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ und Vav in humanen PBMCs gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender. PBMCs wurden aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (n=10) und von MS-Kranken (n=10) isoliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind dargestellt in Relation zu dem gleichen Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe. Gezeigt sind Median, Mittelwert und Standardabweichung des Basalwertes zum Zeitpunkt t=0, unstimuliert. Der p-Wert wurde im Wilcoxon Zwei- Stichprobentest ermittelt (Signifikanz bei p<0,05).

		Basalwert		Basalwert
Fyn	gesunde Spender	1,30; 3,04± 4,10	**Tec**	0,98; 6,61± 13,00
	MS-kranke Spender	1,00; 1,44± 1,20		1,12; 5,86± 10,95
	p-Wert	0,8501		0,9097
Lck	gesunde Spender	0,97; 1,16± 1,09	**PLCγ**	0,84; 1,18± 1,41
	MS-kranke Spender	0,48; 0,60± 0,55		0,53; 0,67± 0,55
	p-Wert	0,3447		0,5205
ZAP-70	gesunde Spender	1,06; 4,65± 7,40	**Vav**	1,52; 9,39± 15,68
	MS-kranke Spender	2,60; 3,11± 3,09		5,43; 7,93± 7,76
	p-Wert	0,6776		0,6232

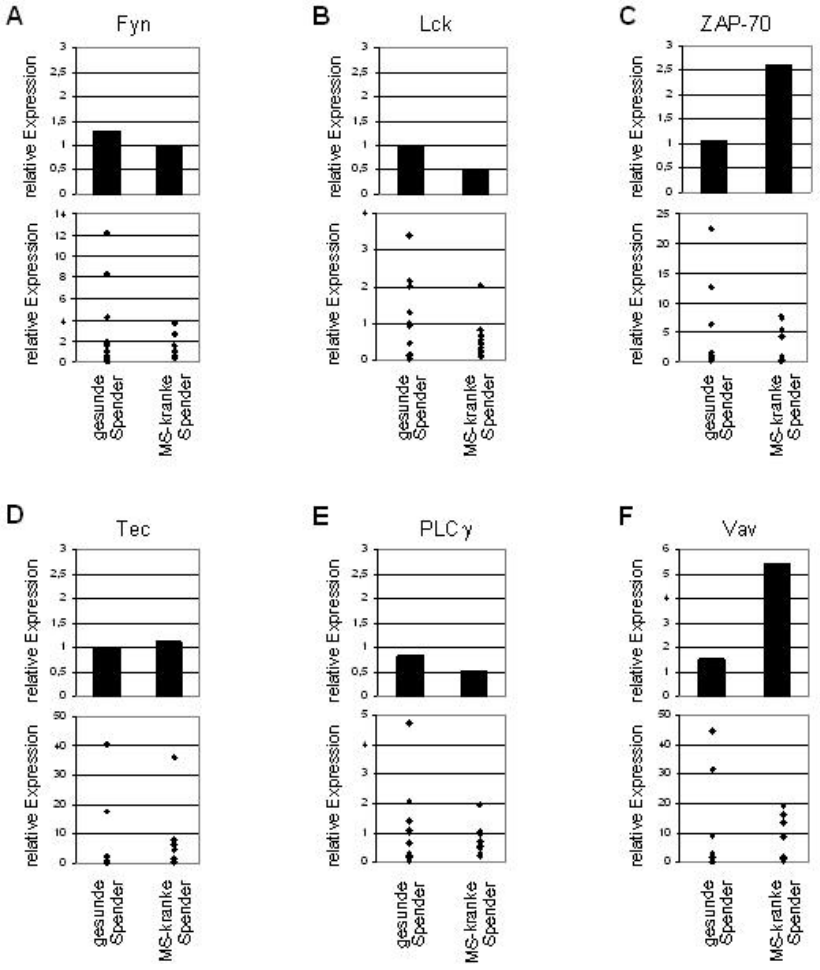

Abb.13: Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten humanen T-Zellen gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender. PBMCs wurden aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (n=10) und von MS-Kranken (n=10) isoliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind dargestellt in Relation zu dem gleichen Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe (Nr. 3). Gezeigt ist der Median von jeweils 10 Spendern und jeweils darunter die Genexpression der einzelnen Spender. **A** Fyn. **B** Lck. **C** ZAP-70. **D** Tec. **E** PLC. **F** Vav.

3.2.2. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in humanen primären T-Zellen bei verschiedenen Stimulationsbedingungen

Es wurde publiziert, dass Änderungen in der Expression von Signaltransduktionsproteinen ein wichtiger Faktor bei der Modulation von T-Zellaktivitäten und bei der T- Zellaktivierung sind. T- Zellen können durch Expressionsveränderungen reifen und dadurch auch verstärkte T-Zell-Effektorfunktionen erreichen (Slifka and Whitton, 2001), (Riley et al., 2002). Deshalb wurden die Zellen der gesunden und an Multiple Sklerose erkrankten Spender bei verschiedenen Stimulations-bedingungen untersucht.

Die PBMCs von freiwilligen, gesunden Spendern und von MS- Kranken (n=20) wurden 24 h jeweils mit antiCD3 oder Cop (Copolymer1, Glatirameracetat) stimuliert. Die relative Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real- time- PCR ermittelt (Abb.14).

Durch die antiCD3- Stimulation ergaben sich bei allen Signaltransduktions-proteinen außer bei Tec erhöhte Expressionen sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken (Abb. 14, Tabelle 7). Bei Fyn, ZAP-70 und Vav war die Genexpression bei den MS- Kranken um circa 30% weniger hochreguliert als bei der gesunden Gruppe. Im Wilcoxon Zwei Stichprobentest ergaben sich keine statistisch auffälligen Unterschiede bei der antiCD3- Stimulation zwischen Gesunden und Kranken ($p>0,05$,Tabelle 7).

Die Cop- Stimulation bewirkte bei den Gesunden keine Änderung der Genexpression. Bei den MS-Kranken dagegen wurden PLCγ und Tec induziert (Abb.14). Der Wilcoxon- Test zeigte keine statistische Auffälligkeit ($p>0,05$, Tabelle 7).

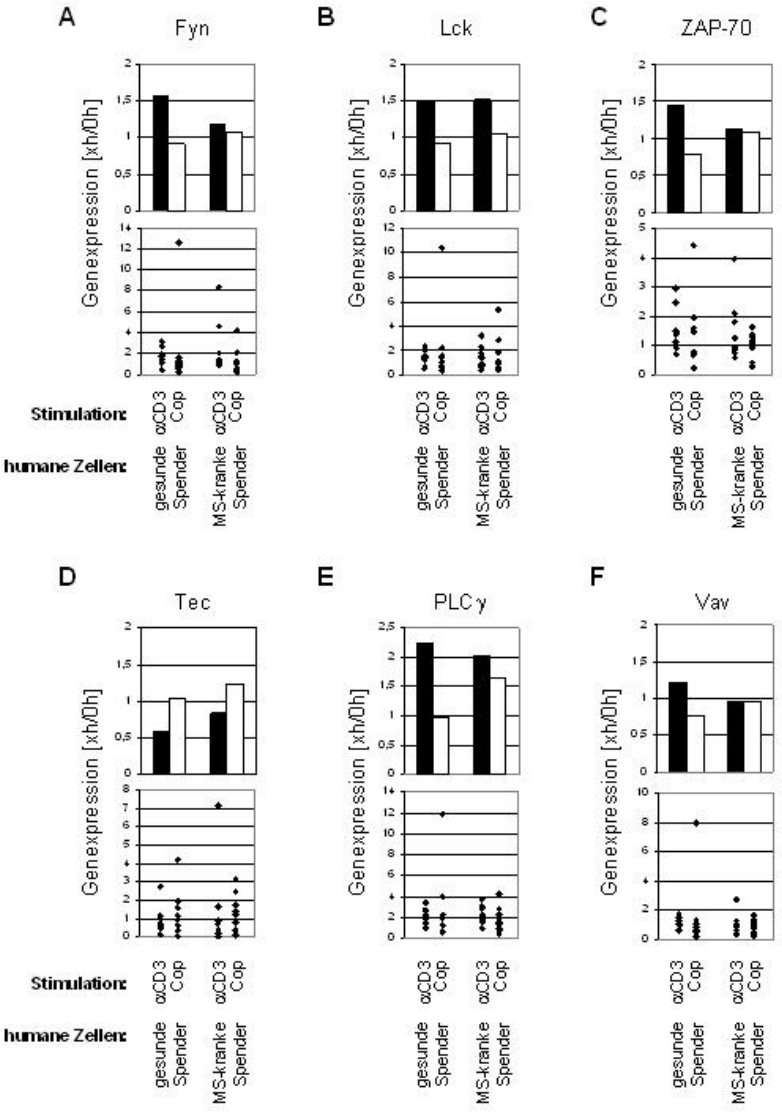

Abb.14: Verlauf der Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine bei verschiedenen Stimulationsbedingungen in humanen T-Zellen gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender. PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurden aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern und von MS-Kranken isoliert. Die Zellen wurden dann 24h jeweils mit antiCD3 (αCD3) oder Cop stimuliert. Die relative Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde nach RNA-Isolierung und nach Umschreiben in cDNA mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind dargestellt in Relation zu dem gleichen Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe. Gezeigt ist der Median von jeweils 10 Spendern und jeweils darunter die Genexpression der einzelnen Spender. **A** Fyn. **B** Lck. **C** ZAP-70. **D** Tec. **E** PLC. **F** Vav.

Tabelle 7 ▼: Vergleich der mRNA-Expression der Signaltransduktionsproteine in humanen PBMCs gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender bei verschiedenen Stimulationsbedingungen. PBMCs wurden aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern (n=10) und von MS-Kranken (n=10) isoliert und 24h mit antiCD3 oder Cop stimuliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind dargestellt in Relation zu dem gleichen Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe. Gezeigt sind Median, Mittelwert und Standardabweichung des Quotienten (Wert nach antiCD3-Stimulation bzw. Cop-Stimulation/Basalwert) zum Zeitpunkt t=24h. Der p-Wert wurde im Wilcoxon Zwei-Stichprobentest ermittelt (Signifikanz bei p<0,05).

		antiCD3/Basalwert	Cop/Basalwert
Fyn	gesunde Spender	1,58; 1,70± 0,77	0,92; 3,72± 2,06
	MS-kranke Spender	1,18; 2,24± 2,43	1,07; 1,13± 1,32
	p-Wert	0,3447	0,3447
Lck	gesunde Spender	1,20; 1,55± 0,62	0,93; 1,98± 3,00
	MS-kranke Spender	1,52; 1,54± 0,86	1,05; 1,59± 1,50
	p-Wert	0,2123	0,8501
ZAP-70	gesunde Spender	1,45; 1,70± 0,81	0,78; 1,30± 1,24
	MS-kranke Spender	1,12; 1,46± 1,00	1,09; 1,03± 0,41
	p-Wert	0,4274	0,5708
Tec	gesunde Spender	0,59; 0,83± 0,73	1,05; 1,30± 1,25
	MS-kranke Spender	0,84; 1,37± 2,08	1,24; 1,34± 0,92
	p-Wert	0,7337	0,9698
PLCγ	gesunde Spender	2,23; 2,27± 0,83	0,98; 2,44± 3,49
	MS-kranke Spender	2,02; 2,27± 0,88	1,65; 1,81± 1,13
	p-Wert	0,4727	0,3847
Vav	gesunde Spender	1,23; 1,20± 0,35	0,77; 1,48± 2,31
	MS-kranke Spender	0,95; 1,05± 0,67	0,97; 0,94± 0,44
	p-Wert	0,089	0,8501

Insgesamt war die Expression nach antiCD3-Stimulation stärker hochreguliert als nach Cop- Stimulation (Abb. 15). Statistische Auffälligkeiten wurden im Wilcoxon Test nachgewiesen beim Protein Fyn (p=0,003). PLCγ und Vav ergaben einen p- Wert um 0,1 (Tabelle 8). Beim Vergleich der Wechselwirkungen zwischen Gesund/Krank und den Stimulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Auffallend war jedoch eine Häufung der Werte von MS- Kranken, bei denen die Cop- und antiCD3- Stimulation circa 1 betrug (Abb. 15).

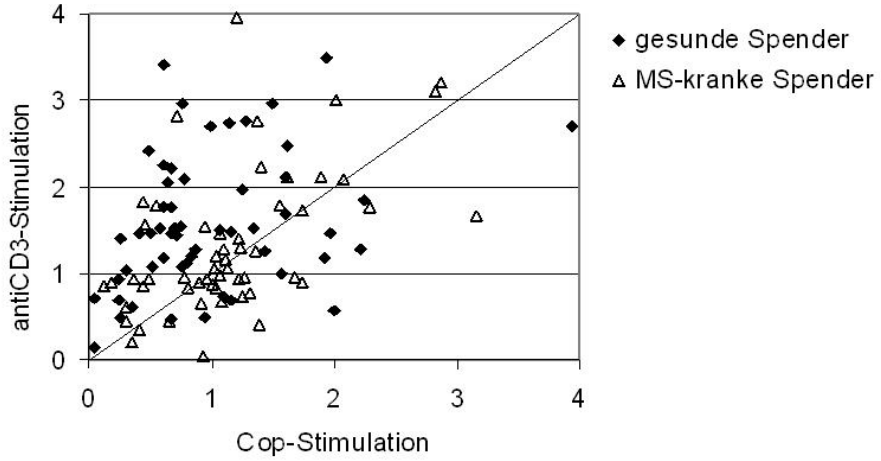

Abb. 15 ▲: AntiCD3 versus Cop-Stimulation bei den Signaltransduktionsproteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ und Vav in humanen PBMCs gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender. Gezeigt sind die Werte der Genexpression aller Spender (n=20) bei den getesteten Signaltransduktionsproteinen (n=6). Die Daten entsprechen jeweils dem Quotienten aus dem Stimulationswert (antiCD3 oder Cop) durch den Basalwert (t=0). Einzelne Werte im Bereich x oder y >4 bzw. <14 sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt und verändern die Schlußfolgerungen nicht.

Tabelle 8 ▼: Vergleich der Stimulationsbedingungen antiCD3 versus Cop-Stimulation bei den Signaltransduktionsproteine in humanen PBMCs gesunder und an Multiple Sklerose erkrankter Spender. Gezeigt ist der p-Wert aller Spender (Vergleich antiCD3 versus Cop) sowie der p-Wert beim Vergleich zwischen gesunden und kranken Spendern (Wechselwirkungen zwischen Gesund/Krank und den Stimulationen). Der p-Wert wurde im Wilcoxon Zwei- Stichprobentest ermittelt (Signifikanz bei p<0,05).

		antiCD3 vs. COP		**antiCD3 vs. COP**
Fyn	alle Spender	p= 0,003 ***	Tec	p= 0,263
	gesunde Spender vs. MS-kranke Spender	p= 0,308		p= 0,571
Lck	alle Spender	p= 0,824	PLCγ	p= 0,115
	gesunde Spender vs. MS-kranke Spender	p= 0,571		p= 0,385
ZAP-70	alle Spender	p= 0,263	Vav	p= 0,115
	gesunde Spender vs. MS-kranke Spender	p= 0,273		p= 0,571

3.2.3. Anreicherung IL-2 produzierender Zellen nach MBP-Stimulation mittels IL-2 Secretion Assay in humanen PBMCs

Um genau die Zellen anzureichern, die nach Stimulation mit MS-spezifischen Antigenen IL- 2 produzieren und somit für die inadäquate Immunantwort hauptverantwortlich sind, wurde ein IL- 2- Secretion Assay (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Für die Analyse wurden PBMCs eines gesunden und eines MS-kranken Spenders mit MBP restimuliert. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Probe nicht stimuliert und eine Probe als Positivkontrolle mit SEB stimuliert. Das Versuchsprotokoll wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Zugabe des Il- 2 spezifischen „Catch Reagent“ ermöglichte die sofortige Bindung des in die unmittelbare Umgebung sezernierten Zytokins an die positiven Zellen. Mit dem anti- IL- 2 Antikörper, konjugiert an Phycoerythrin, konnten die Leukozyten im FACS analysiert werden. Durch Bindung an Anti-PE MicroBeads wurden dann die IL- 2 sezernierenden Zellen mittels MACS (magnetic activated cell sorting) angereichert und danach wiederum einer FACS- Analyse unterzogen. Durch Doppelfärbung mit antiCD4- FITC konnte der Anteil der IL- 2- produzierenden $CD4^+$ Zellen an den $CD4^+$- Zellen bestimmt werden. Tote Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und ausgeschlossen.

Bei gesundem und krankem Spender konnten $IL2^+CD4^+$ Zellen durch den IL- 2 Secretion Assay angereichert wurden. Beim MS-kranken Spender ergaben sich durch die Stimulation mit MBP mehr Zellen als ohne Stimulation. Beim gesunden Spender stellte sich die Situation umgekehrt dar (Abb.16).

Beim Vergleich zwischen gesundem und kranken Spender zeigte sich, dass beim kranken Spender auch ohne Stimulation diskret mehr IL- 2 produzierende Zellen nachgewiesen wurden als beim Gesunden. Besonders deutlich stellte sich der Unterschied zum Gesunden nach der Stimulation mit dem MS-typischen Protein MBP dar: es waren 9 fach mehr IL- 2 produzierende Zellen beim MS- kranken Spender vorhanden (Abb.16).

Um eine ausreichende Zellzahl für weitere Analysen mittels real- time RT- PCR zu gewinnen, wären zu große Ansätze bzw. Blutspenden notwendig .

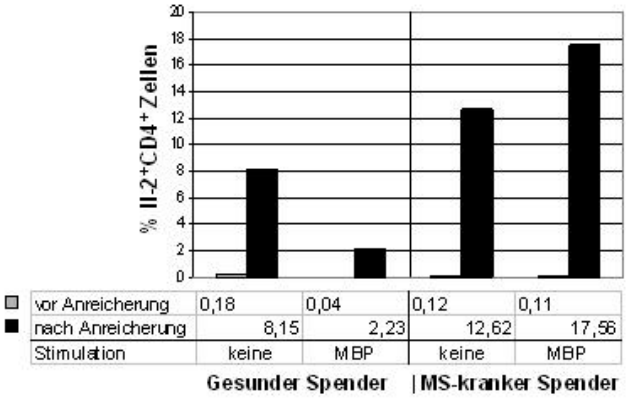

Abb.16 : Anreicherung Il-2 produzierender Zellen mittels Il-2 Secretion Assay ohne und mit MBP-Stimulation in humanen PBMCs. PBMCs wurden aus Heparin-Blut eines freiwilligen, gesunden Spenders und eines MS-Kranken isoliert, mit MBP stimuliert und mittels Il-2 Secretion Assay auf Zytokin-produzierende Zellen untersucht. Dargestellt sind % Il-2^+CD4^+Zellen (Anteil der IL-2-produzierenden $CD4^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen) vor und nach Anreicherung durch MACS (magnetic cell sorting) sowie ohne und mit MBP-Stimulation.

3.3. Vergleichende Expressionsanalysen in Modellzellen

3.3.1. Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten Modellzellen

Für die eingehende Analyse der Signaltransduktionskomponenten wird ein Modellsystem für zelluläre Autoimmunität benötigt. Zu diesem Zweck sollten die Transfektanten der murinen BW58$\alpha^-\beta^-$- Modellzelle etabliert werden. Die Modellzellen sind $CD4^+$ und transfiziert mit einem TCR eines Multiple Sklerose-Patienten (spezifisch für MBP 139-51= BBC, für MBP 80- 99 = SS8) Die BBC-CD28-Modellzelle ist zusätzlich mit einem humanen CD28- Korezeptor transfiziert. Die Modellzellen können Il– 2 produzieren.

Mittels FACS-Färbung wurden die Oberflächenmarker vor den Versuchen bestätigt (BBC, SS8, BBC-CD28 (alle murin), Jurkat (human): CD3, BBC-CD28, Jurkat: CD28 human).

Um zu analysieren, ob sich die Charakteristika bei den Signaltransduktionsproteinen der humanen nativen T- Zellen auch bei den neuen Modellzellen nachweisen lassen, sollten zunächst ebenfalls die Expressionen der definierten Proteine untersucht werden. Für den quantitativen Vergleich der ausgewählten Signaltransduktionsproteine wurde deshalb die Genexpression in unstimulierten Modellzellen mittels real- time- PCR untersucht und mit der etablierte Modellzelle Jurkat verglichen.

Die Versuche zeigten, dass die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im Vergleich zu den Jurkat- Zellen bei den für die Calcium-Freisetzung wichtigen Proteinen insgesamt ein ähnliches Genexpressionsniveau besaßen (Abb.11). Die Proteinkinase Tec (Abb.11D) war jedoch bei den 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten circa 10fach höher exprimiert als bei den Jurkat- Zellen. Bei ZAP-70 und Vav war die Genexpression bei den Jurkat- Zellen leicht erhöht. Im Dunnett- Test waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch auffällig.

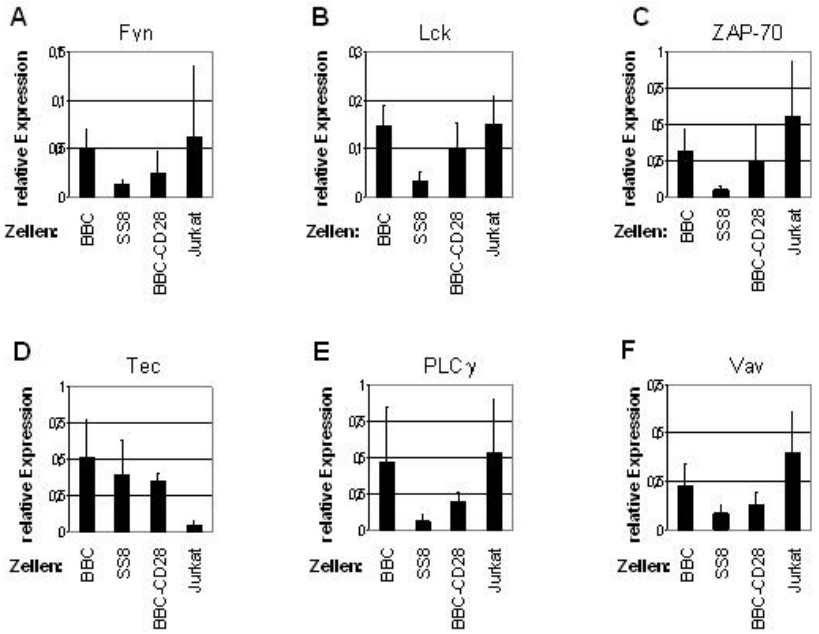

Abb.11: Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten Modellzellen. Die basale RNA-Expression der Proteine wurde mittels real-time RT-PCR ermittelt. Dargestellt sind jeweils die Modellzellen BBC, SS8, BBC-CD28 und Jurkat. Alle Ergebnisse sind bezogen auf das gleiche Kontrollgen (18S rRNA) und dargestellt relativ zu einer humanen T-Zellprobe (Nr.3, Abb.13). Hier ist der Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten gezeigt. **A** Fyn. **B** Lck. **C** ZAP-70. **D** Tec. **E** PLC. **F** Vav.

3.3.2. Verlauf der Genexpression ausgewählter Signaltransduktions-proteine in Modellzellen bei verschiedenen Stimulationsbedingungen

Um die Änderung der Genexpression der Signaltransduktionsproteine zu untersuchen, wurden die Modellzellen verschiedenen Stimulationsbedingungen ausgesetzt.

Die Modellzellen BBC, BBC-CD28, SS8 und Jurkat wurden 6, 12 und 24 Stunden mit antiCD3 stimuliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde dann mittels real- time RT- PCR relativ quantifiziert.

Weiterhin wird der Korezeptor CD28 für die optimale T-Zellaktivierung benötigt. Um den Einfluß der Kostimulation mit antiCD28 bei den Modellzellen zu testen, wurden die BBC-CD28- und Jurkat- Modellzellen mit antiCD3 und antiCD28 ebenfalls 6, 12 und 24 Stunden stimuliert.

Damit darüber hinaus Expressionsveränderungen der BBC- Modellzellen bei physiologischer Stimulation mit MS- typischen Proteinen untersucht werden konnten, wurden jene mit den MBP beladenen DR- Zellen stimuliert.
Zum Vergleich wurden Splenozyten von SJL- Mäusen stimuliert. Anschließend wurde die Genexpression wieder mittels real-time RT-PCR relativ quantifiziert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.
Insgesamt ergaben sich für die Jurkat- Modellzellen bei 6 h Einfachstimulation geringere Expressionen als bei 0 h. Es zeigte sich jedoch eine 3 (Vav) bis 9 (Fyn) fache Hochregulation nach 12 h und vor allem 24 h bei allen untersuchten Proteinen (Abb. 12; Daten- Tabelle im Anhang).
Bei den BBC- und SS8- Zellen fanden sich nur diskrete Veränderungen der Genexpression der Signaltransduktionsproteine. Die Expressionen bei Fyn, ZAP-70 und Vav zeigten eine Hochregulation mit Betonung bei 12 h und bei Vav bei 24 h Stimulation (Abb.12 A/C/F). Bei Lck, Tec und PLCγ ergab sich eine Herunter- Regulation zu allen Zeitpunkten (Abb.12 B/D/E).
Im Verhältnis zu den Jurkat- Zellen exprimierten die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten Vav bei antiCD3- Stimulation vergleichsweise hoch und Fyn vergleichsweise gering.
Bei der Doppelstimulation mit antiCD3/antiCD28 fanden sich, wie erwartet, stärkere Expressionserhöhungen im Vergleich zur Einfachstimulation mit antiCD3. Bei allen untersuchten Signaltransduktionsproteinen wurden die untersuchten Gene der Jurkat- Zellen mit Doppelstimulation stärker hochreguliert als die Gene der BBC- CD28 Modellzellen. Jurkat Zellen wurden mit antiCD3 ferner sogar stärker hochreguliert als BBC- CD28 Modellzellen mit der Doppelstimulation antiCD3/antiCD28. Besonders deutlich war dies zu erkennen bei Fyn, Tec und PLCγ.

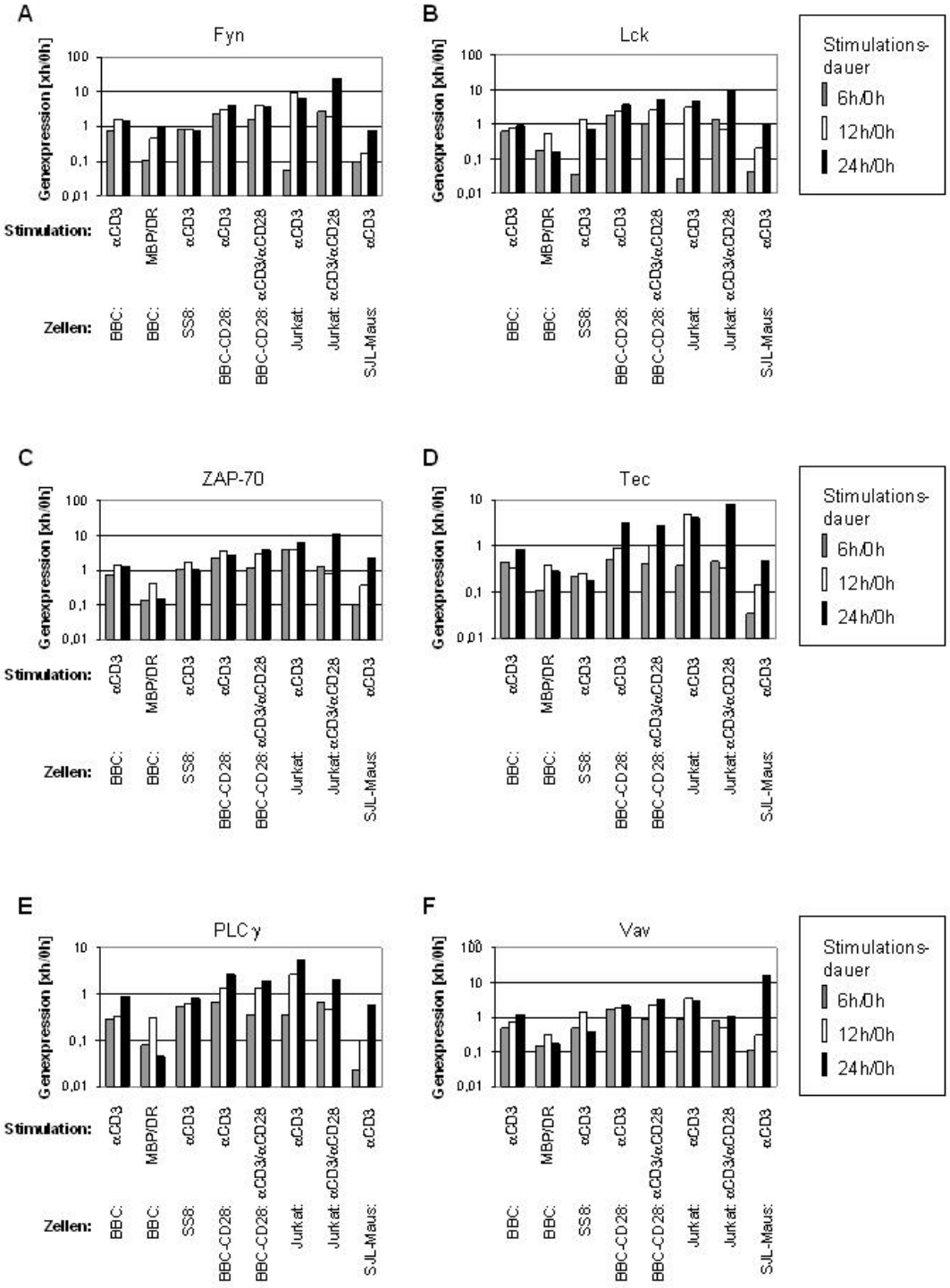

Abb.12: Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in stimulierten Modellzellen. Die Zellen (58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten, Jurkat, SJL- Maus- Zellen) wurden 6, 12 und 24 h mit antiCD3 (αCD3), antiCD3/antiCD28 (αCD3/αCD28) oder MBP/DR stimuliert. Die relative Genexpression in den Modellzellen wurde mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind dargestellt in Relation zu dem gleichen Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T- Zellprobe (Abb.13). Die Genexpressionsverläufe der Hoch- bzw. Runterregulation zu den jeweiligen Zeitpunkten sind bezogen auf 0 h. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch von drei (Nr.2). **A** Fyn. **B** Lck. **C** ZAP-70. **D** Tec. **E** PLC. **F** Vav.

Für die Jurkat- Zellen ergaben sich bei 6 h Stimulation bei allen Genen außer bei Vav stärkere Hochregulationen bei der antiCD3/antiCD28-Stimulation im Vergleich zur antiCD3-Stimulation (Abb.12). Bei 12 h waren die Jurkat Zellen jedoch bei der Einzelstimulation stets stärker hochreguliert. Diese Hochregulation war zwar um das 2 (PLCγ) bis 9 (Fyn) fache höher als bei der Doppelstimulation, jedoch deutlich niedriger als der Maximalwert der Doppelstimulation bei 24 h. Bei 24 h Doppelstimulation fanden sich im Vergleich zur Einfachstimulation 2 (Lck, ZAP-70, Tec) bis 4 fach (Fyn) höhere Expressionen. Die Vav- und PLCγ- Expression war jedoch um 30 % bis 50 % niedriger bei der Doppelstimulation (Daten- Tabelle im Anhang).

Die BBC-CD28- Zellen zeigten geringere Unterschiede als die Jurkat- Zellen und niedrigere Hochregulationen. Die größten Unterschiede ließen sich bei Vav nachweisen. Hier fand sich eine 1,5fach höhere Expression bei Doppelstimulation. Auch bei Lck (1,3 fach), Fyn und ZAP-70 (1,4 fach) wurden im Vergleich zur Einfachstimulation erhöhte Werte gemessen. Bei allen getesteten Proteinen schienen die BBC-CD28- Modellzellen allein durch die Anwesenheit des CD28- Korezeptors stärker hochregulierbar, auch wenn sie nur mit antiCD3 stimuliert werden (Abb.12). Im Unterschied zu den BBC-Zellen ohne transfizierten CD28-Korezeptor wiesen die BBC-CD28-Zellen mit Doppelstimulation zu allen Zeitpunkten und bei allen Signaltransduktionsproteinen deutlich höhere Expressionen auf.

Insgesamt exprimierten die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im Verhältnis zu den Jurkat-Zellen bei Doppelstimulation wiederum Vav hoch und Fyn vergleichsweise niedrig.

Die physiologische Stimulation der BBC-Zellen mit den MBP-beladenen DR-Zellen zeigte bei Fyn und ZAP-70 ähnliche Verläufe wie die antiCD3-Stimulation der 58$\alpha^-\beta^-$-Transfektanten. Jedoch wurden die Genexpressionen der Zellen stärker herunterreguliert als bei Antikörper-Stimulation. Bei allen untersuchten Genen wurde der Höhepunkt der Expression bei 12h gemessen (Abb.12).

Wie bei der physiologischen Stimulation waren die Zellen der SJL-Maus stärker herunterreguliert als die BBC-Modellzellen.

Insgesamt veränderten sich also die Expressionen der Signaltransduktionsproteine zu den jeweiligen Stimulationszeitpunkten. Es wurden sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen Jurkat und den 58$\alpha^-\beta^-$-Transfektanten beobachtet. Der Verlauf der Genexpressionen stellte sich zum Teil als unterschiedlich heraus. Die Gene der Transfektanten wurden nicht so stark hochreguliert und schienen stärker abhängig von einer Doppelstimulation. Die größten Veränderungen konnten meistens bei 24h beobachtet werden.

3.4. Funktionelle Analyse der 58$\alpha^-\beta^-$-Transfektanten und weiteren Modellzellen mittels Calcium-Imaging

Um die neuen Modellzellen funktionell zu analysieren, wurde Calcium- Imaging durchgeführt und die Ergebnisse mit etablierten Modellzellen verglichen. Es wurden die Transfektanten der 58$\alpha^-\beta^-$- Zelllinie und Jurkat- Zellen untersucht. Mittels FACS-Färbung wurden die Oberflächenmarker vor den Versuchen bestätigt.

Zur Stimulation beim Ca- Imaging wurden antiCD3 und antiCD28 eingesetzt. Während der Inkubation der Antikörper auf hydrophobisierten Deckgläschen, wurde der Calcium-Farbstoff Fluo3 zu den Modellzellen hinzugefügt. Das Calcium- Signal wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt (Abb.4). Dazu wurden die Zellen in festgelegter Endkonzentration auf die präparierten Deckgläschen in einer Mikroskopierkammer pipettiert. Es wurde dann sofort über einen Zeitraum von 10 Minuten mikroskopiert, wobei alle 10 Sekunden eine Bildaufnahme erfolgte. Als Negativkontrolle diente ein mit PBS statt Antikörper inkubiertes Deckgläschen, als Positivkontrolle eine Probe, zu der das Calciumionophor Ionomycin unter Mikroskopkontrolle gegeben wurde.

Die Jurkat- Zellen zeigten eine deutliche Aktivierung nach antiCD3- Stimulation, aber keine eindeutig verstärkte Aktivierung nach Stimulation mit antiCD3 und antiCD28 (Abb.6). Bei den 58□$^-$□$^-$- Transfektanten war der Calcium-Einstrom mit Ionomycin induzierbar, die Zellen zeigten aber dennoch auf antiCD3- oder BSA-Stimulation hin keine eindeutigen Calcium- Signale (Abb.7, nicht

dargestellt: SS8). Auch bei der antiCD3/antiCD28- Doppelstimulation der BBC-CD28- Zellen waren die diskreten Calcium- Signale geringer als bei Jurkat (Abb.8).

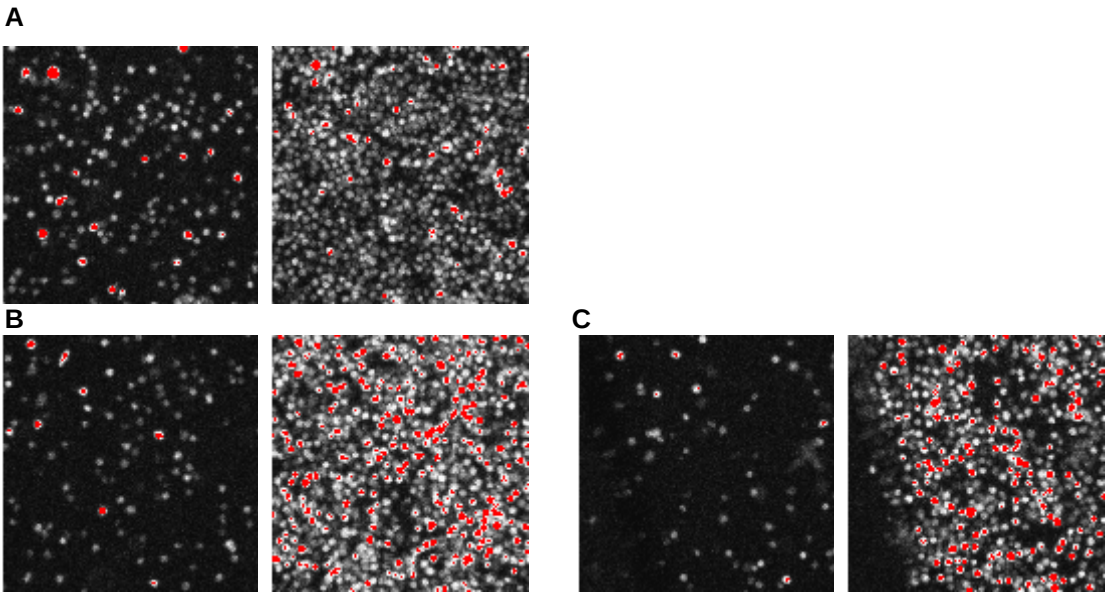

Abb.6: Analyse der Stimulierbarkeit der Modellzelle Jurkat mittels Calcium-Imaging.
A Negativkontrolle (PBS). **B** Stimulation mit antiCD3. **C** Stimulation mit antiCD3 und antiCD28. Dargestellt sind jeweils das erste und das letzte Bild (Bild 60) der Zeitserie über 10min.

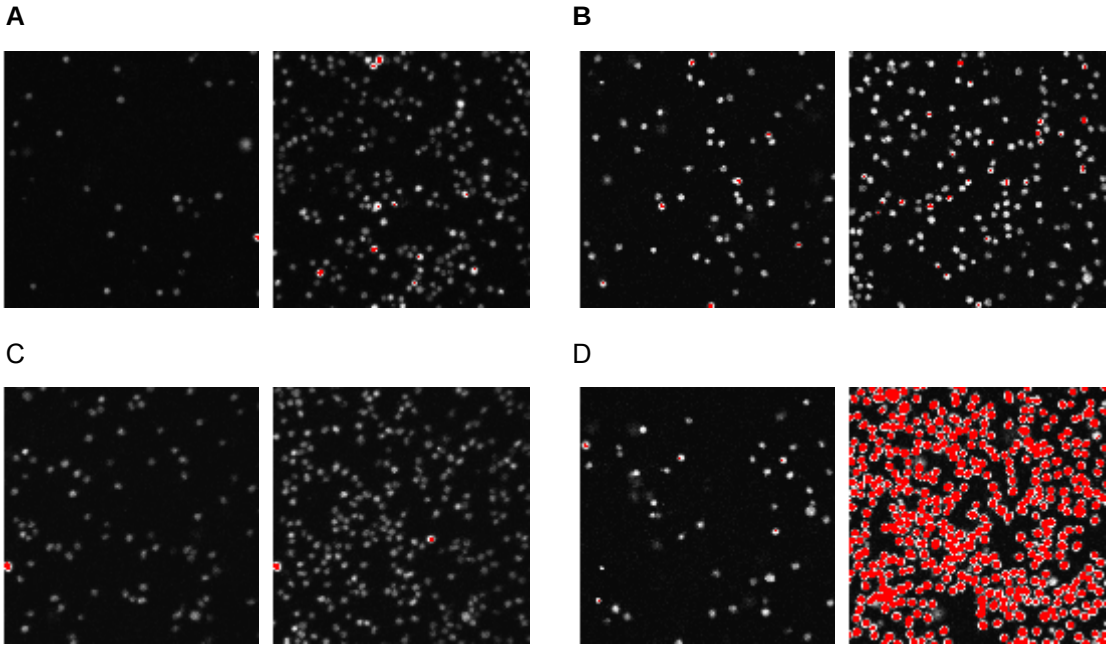

Abb.7: Analyse der Stimulierbarkeit der Modellzelle BBC mittels Calcium-Imaging.
A Negativkontrolle (PBS). **B** Stimulation mit antiCD3. **C** Stimulation mit BSA. **D** Induktion des Calcium-Einstroms mit Ionomycin. Dargestellt sind jeweils das erste und das letzte Bild (Bild 60) der Zeitserie über 10min.

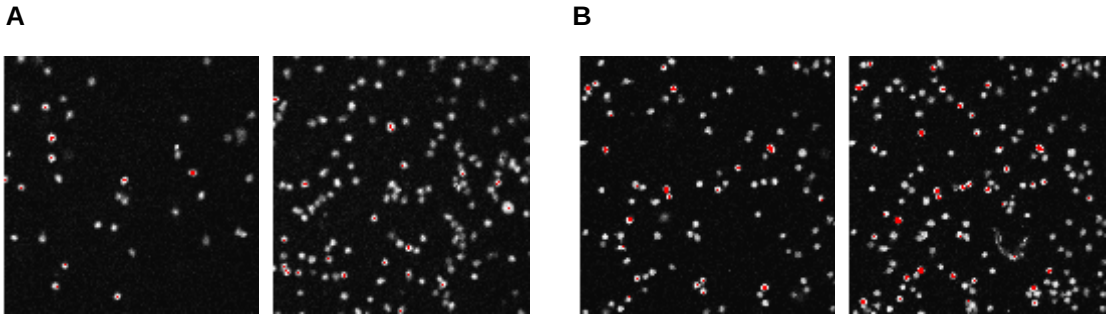

Abb.8: Analyse der Stimulierbarkeit der Modellzelle BBC-CD28 mittels Calcium-Imaging. **A** Stimulation mit antiCD3. **B** Stimulation mit antiCD3 und antiCD28. Dargestellt sind jeweils das erste und das letzte Bild (Bild 60) der Zeitserie über 10min.

4 . Diskussion

4.1. Vergleichende Analysen humaner T-Zellen gesunder und an MS erkrankter Spender

In zahlreichen Arbeiten werden bestimmte T-Zell-Signaltransduktionsproteine für die Entstehung von Immundefekten und Autoimmunität verantwortlich gemacht (Grunebaum and Roifman, 2001; Ohashi, 2002; Salojin et al., 1997).
Es wurden deshalb wichtige Proteine der T-Zell-Signaltransduktion ausgewählt, die in Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunität stehen könnten und gleichzeitig eine Schlüsselrolle bei der Calciumfreisetzung spielen (Leo et al., 2002), (Lewis C.M. et al., 2001), (Cantrell, 1998). Die Expression der Proteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ, Itk und Vav wurden mittels real- time-PCR analysiert. Um die Vergleichbarkeit zwischen humanen nativen T-Zellen und verschiedenen murinen und humanen Modellsystemen zu ermöglichen, wurden interspezifische Primer für die definierten Signaltransduktionsproteine generiert.
Um zu untersuchen, ob sich bei den Signaltransduktionsproteinen Unterschiede zwischen gesunden und MS- kranken Spendern finden, wurden PBMCs aus EDTA-Blut von freiwilligen, gesunden Spendern und von MS-Kranken isoliert. Die Genexpression der Signaltransduktionsproteine wurde mittels real-time RT-PCR ermittelt.
Die Ergebnisse zeigten, dass bei den MS-Kranken ZAP-70 und Vav höher exprimiert waren, während Lck und PLCγ geringer exprimiert waren als bei den gesunden Spendern (Abb.13). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch auffällig (Wilcoxon Test, $p>0,5$).
In der Literatur wird beschrieben, dass ZAP-70 und Vav durch Cbl-b negativ reguliert werden. Cbl-defiziente Mäuse zeigen vermehrtes Auftreten von EAE (Bachmaier et al., 2000; Chiang et al., 2000). Eine fehlende oder insuffiziente Inhibition könnte also für diese Situation verantwortlich sein. ZAP-70 wird weiterhin überexprimiert bei CLL gefunden (Crespo et al., 2003). Eine hohe Expression der Proteine ist gut vereinbar mit einer starken Reaktion auf Selbst oder Fremd-Antigene sowie einer Expansion von autoreaktiven T-Zellen und mit

einer daraus resultierenden erhöhten Empfindlichkeit für die Entstehung von Autoimmunität. Außerdem wird in der Literatur beschrieben, dass eine hohe ZAP-70 Expression eine Reifung von Th1-Zellen bei MBP-autoreaktiven T-Zellen begünstigt (Singh et al., 1999). Dies könnte für die Multiple Sklerose von Bedeutung sein. Jedoch wird im Gegensatz dazu eine geringere Lck-Expression bei Rheumatoider Arthritis in Studien beschrieben sowie eine Defizienz der Lck-Expression in T-Lymphozyten von Typ I- Diabetikern (Nervi et al., 2000; Romagnoli et al., 2001). Der Typ I- Diabetes und die Multiple Sklerose können unter anderem Th1- vermittelt entstehen. Es wurde sogar eine positive Korrelation zwischen insulinabhängigem Diabetes und Multipler Sklerose beobachtet. Auch eine gestörte PLCγ- Aktivierung wird bei NOD-Mäusen beschrieben (Salojin et al., 1997). Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch präexistente geringere Expressionen die Reifung und Toleranzentwicklung von Thymozyten gestört sein könnte. Als Konsequenz daraus könnte das periphere Th1/Th2-Verhältnis verschoben sein. Eine Differenzierung in Richtung Th2-Zellen bedarf beispielsweise einer hohen Lck-Expression (Lucas et al., 1999). Eine verminderte Expression könnte also entweder Ursache eines veränderten Th1/Th2-Verhältnisses sein oder auch als Folge entstehen. Es wird vermutet, dass eine Krankheitsprogression von Diabetes bei NOD-Mäusen in Zusammenhang steht mit einer Reduktion des Th2/Th1- Zellen Verhältnisses (Hartemann et al., 1999). Auch bei der MS scheint eine derartige Pathogenese eine Rolle zu spielen. Es muß jedoch immer auch berücksichtigt werden, dass eine Momentaufnahme nicht die ständigen Veränderungen berücksichtigt, denen die T-Zellen ausgesetzt sind. Die Zellen könnten einerseits durch einen Stimulus die Expression bestimmter Proteine erhöhen, sie könnten aber auch andererseits im Begriff sein, die Expression dieser Proteine zur Kompensation oder zum Schutz der Zelle vor Aktivierung zu erniedrigen.

Es wurde publiziert, dass Änderungen in der Expression von Signaltransduktionsproteinen ein wichtiger Faktor bei der Modulation von T-Zellaktivitäten und bei der T- Zellaktivierung sind. T- Zellen können durch Expressionsveränderungen reifen und dadurch auch verstärkte T-Zell-Effektorfunktionen erreichen (Slifka and Whitton, 2001), (Riley et al., 2002).

Deshalb wurden die Zellen der gesunden und an Multiple Sklerose erkrankten Spender bei verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht.

Bei der antiCD3- Stimulation (24 h) ergaben sich bei allen Signaltransduktionsproteinen außer bei Tec erhöhte Expressionen sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken. Fyn, ZAP-70 und Vav waren aber bei den MS-Kranken weniger hochreguliert als bei der gesunden Gruppe (Abb.14). Dies würde für eine antiCD3- unabhängigere Regulation der Proteine sprechen, da gerade diese hohe Grundexpressionen zeigten. Im Wilcoxon Zwei Stichprobentest ergaben sich jedoch keine statistisch auffälligen Unterschiede bei der antiCD3- Stimulation zwischen Gesunden und Kranken ($p>0,05$,Tabelle 7). Dies könnte auch an der im Bezug zur Größe der Messvariation kleinen Fallzahl liegen. Bei der Cop- Stimulation fiel auf, dass bei den Gesunden nur bei Tec eine geringe Hochregulation stattfand (Abb.14). Während bei den MS-Kranken alle untersuchten Proteine geringe Hochregulationen aufwiesen. Vor allem bei PLCγ war die Expression deutlich höher (Abb.14E).

MS-Kranke lassen zwar teilweise geringere Ansprechbarkeit auf antiCD3 erkennen, jedoch liegt die Betonung deutlicher bei der Stimulation mit Cop als bei den Gesunden. Die stärkere Expressionserhöhung vor allem bei PLCγ bei den Zellen MS- Kranker könnte die Verschiebung von Th1 zu Th2-Zellen (shift) widerspiegeln.

Differente Schädigungswege bei der MS- Entstehung und damit die Auswahl der Patienten komplizieren die Situation zusätzlich (Lucchinetti et al., 2000). Die Relevanz der in vitro –Befunde für eine in vivo Situation bleibt daher offen. Abweichungen der Ergebnisse der T- Zellen gesunder Spender von in der Literatur beschriebenen Daten könnten auch durch das begrenzte untersuchte Kollektiv sowie durch leicht unterschiedliche Versuchsanordnungen begründet sein (Riley et al., 2002).

Außerdem stellt sich die Frage, ob die real- time RT- PCR eine geeignete Methode zur Untersuchung der Genexpression von autoreaktiven humanen T-Zellen sein kann. Vorteile bieten eine hohe Sensitivität und eine niedrige Variationsbreite innerhalb eines Versuchs. Darüber hinaus können Genexpressionsprofile aus einem Minimum an Zellen bestimmt werden und die

Spezifität der Produkte kann durch Analyse der Schmelzkurven leicht überwacht werden. Es ist aber einerseits noch nicht genau geklärt ist, wieviele Zellen im Blut MS- Kranker tatsächlich autoreaktiv sein können. Andererseits ist nicht klar, ab welcher Grenze Unterschiede in Genexpressionen bei einem geringen Anteil von autoreaktiven Zellen in peripherem Blut überhaupt bestimmt werden können. Um bei den humanen Zellen die MBP- sensitiven Zellen herauszufiltern, wurde deshalb ein Il- 2 Secretion Assay durchgeführt. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass durch den Il-2 Secretion Assay MBP-reaktive Zellen angereichert werden können (Abb.15). Wobei sich bei den MS-Kranken mehr Zellen anreichern ließen als bei gesunden Spendern (Abb.15). Um genügend Zellen zur Analyse mittels real-time RT-PCR oder Microarray zu erhalten, müßte die Technik der Anreicherung noch optimiert werden, da die Blutspende zu hoch wäre.

Insgesamt belegen diese Schwierigkeiten die Komplexität der T- Zell-Signaltransduktion bei Autoimmunität.

4.2. Vergleichende Analysen muriner Modellzellen für Autoimmunität mit etablierten humanen Modellzellen

Für die eingehende Analyse der Signaltransduktionskomponenten wird ein Modellsystem zellulärer Autoimmunität benötigt, das die Charakteristika der natürlichen MHC-TCR- Interaktionen reproduzieren kann und gleichzeitig auch eine Differenzierung zwischen den Beiträgen des TCR und der kostimulatorischen Moleküle ermöglicht.

Die murine BBC -Modellzelle ($CD4^+$, TCR spezifisch für MBP139-51= BBC, MBP 80-99= SS8) sowie die zusätzlich mit einem humanen CD28-Korezeptor transfizierte BBC-CD28-Zelle dienten als neues Modellsystem für zelluläre Autoimmunität, das etabliert werden sollte. Um zu analysieren, ob sich die gefundenen Charakteristika bei den Signaltransduktionsproteinen der humanen nativen T- Zellen auch bei den neuen Modellzellen nachweisen lassen, sollten zunächst ebenfalls die Expressionen der definierten Proteine untersucht werden. Für den quantitativen Vergleich der ausgewählten Signaltransduktionsproteine wurde deshalb die Genexpression in unstimulierten Modellzellen mittels real- time- PCR untersucht und mit der etablierte Modellzelle Jurkat verglichen.

Die Versuche zeigten, dass die $58\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im Vergleich zu den Jurkat- Zellen bei den für die Calcium-Freisetzung wichtigen Proteinen insgesamt ein ähnliches Genexpressionsniveau besaßen (Abb.11). Die Proteinkinase Tec (Abb.11D) war jedoch bei den $58\alpha^-\beta^-$- Transfektanten höher exprimiert als bei den Jurkat- Zellen. Bei ZAP-70 und Vav war die Genexpression bei den Jurkat- Zellen leicht erhöht. Im Dunnett- Test waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch auffällig.

Bei Stimulationsversuchen mit antiCD3 ergab sich für die $58\alpha^-\beta^-$-Transfektanten folgende Situation: Lck, PLCγ und Tec wurden bei Stimulation zu allen Zeitpunkten geringer exprimiert als ohne Stimulation (Abb.:12 B/D/E). Dies wird auch in der Literatur bei humanen T- Zellen beschrieben (Diehn et al., 2002). Die Expressionen bei Fyn, ZAP-70 und Vav zeigten Hochregulationen (Abb.:12 A/C/F). Dies wurde auch in anderen Studien mit humanen T- Zellen

gefunden (Riley et al., 2002). Die Genexpressionen bei den Jurkat- Zellen waren zwar bei 6 h stärker herunterreguliert als die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten, bei 12 und 24 h exprimierten sie aber alle Gene der Signaltransduktionsproteine deutlich höher. Hier waren Fyn und ZAP-70 am stärksten hochreguliert. Möglicherweise besitzen Jurkat- Zellen also eine höhere antiCD3-Empfindlichkeit als humane T- Zellen und als die BBC- Modellzellen. Dies wird auch in anderen Arbeiten beschrieben (Shan et al., 2000).

Insgesamt exprimieren die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im Verhältnis zu den Jurkat-Zellen Vav bei Stimulation vergleichsweise hoch und Fyn gering.

Zahlreiche Studien belegen die Schlüsselrolle des Korezeptors CD28 bei der Aktivierung und Regulation von T-Zell-Aktivitäten und Expressionsveränderungen (Frauwirth and Thompson, 2002). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass eine optimale Kostimulation erforderlich ist, um die Selbsttoleranz zu durchbrechen und Autoimmunität entstehen zu lassen (Pollard et al., 2004).

So zeigten sowohl die etablierten Modellzellen als auch das neue Modellsystem BBC, wie erwartet, höhere Genexpressionen der Proteine bei der antiCD3/antiCD28-Doppelstimulation. Bei den Jurkat-Zellen war dies besonders deutlich bei Fyn. Vav schien am wenigsten beeinflußbar durch die Kostimulation (Abb.12). Vav erscheint laut Studien z.B. dann unabhängiger von CD28-Kostimulation, wenn der Cbl-b-Vav- Signaltransduktionsweg Veränderungen aufweist (Krawczyk et al., 2005). Insgesamt ergab sich also auch bei der Doppelstimulation eine deutlich stärkere Hochregulation im Vergleich zu den neuen Modellzellen. Denkbar wäre, dass in dem neuen chimären Modellsystem andere Affinitäten bestehen als bei der Jurkat-Zelle.

Trotzdem waren auch bei den 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten beim Vergleich BBC-Einzel zu BBC-CD28- Doppelstimulation alle Gene der Signaltransduktionsproteine erhöht exprimiert (Abb. 12). Die Einzelstimulation der BBC-CD28-Zellen war jedoch stärker hochreguliert als die Einzelstimulation der BBC-Zelle. Deshalb kam dieser Effekt beim Vergleich BBC-CD28-Einzel- zu BBC-CD28-Doppelstimulation nur noch diskreter zur Geltung. Dies könnte durch Bildung von CD28- Clustern bei der Transfektion erklärt werden, so dass

höhere Genexpressionen entstehen schon ohne die zusätzliche Kostimulation mit antiCD28. Dieser Effekt könnte jedoch auch bei der Einzel-Stimulation der Jurkat- Modellzelle möglich sein. Dadurch ließen sich einerseits die hohen Werte schon bei Einfachstimulation erklären. Andererseits wären die in der Literatur beschriebene Ergebnisse bei humanen nativen T-Zellen, die ja nicht durch Transfektionen verändert wurden, erklärbar (Riley et al., 2002). Hier war die zusätzliche antiCD28- Stimulation nur diskret expressionserhöhend. Auswirkungen waren hier dennoch gering bei Fyn, ZAP-70 und Vav erkennbar und noch weniger bei Tec und PLCγ.

Insgesamt ist bekannt, dass beim Umgang mit Modellsystemen die genannten Probleme stets in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden müssen.

Dass die Modellzellen trotzdem einer Kostimulation bedürfen, zeigen die Versuche der physiologischen Stimulation der BBC-Zellen mit den MBP-beladenen DR- Zellen. Die alleinige Stimulation führte bei den Zellen zu Herunterregulation der Expression bei den untersuchten Genen. Auch die Expressionen bei den Splenozyten wurden durch Einfachstimulation mit antiCD3 stärker herunterreguliert als alle Modellzellen, sind also eher den Ergebnissen der humanen T-Zellen zuzuordnen.

Um die neuen Modellzellen funktionell zu analysieren, wurde Calcium- Imaging durchgeführt und die Ergebnisse mit etablierten Modellzellen verglichen.

Zur Stimulation wurden antiCD3 und antiCD28 eingesetzt. Die Jurkat- Zellen zeigten eine deutliche Aktivierung nach antiCD3- Stimulation, aber keine eindeutig verstärkte Aktivierung nach Stimulation mit antiCD3 und antiCD28 (Abb.6). Bei den 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten waren auch bei der ntiCD3/antiCD28-Doppelstimulation der BBC-CD28- Zellen die diskreten Calcium- Signale geringer als bei der Einfachstimulation der Jurkat- Modellzellen (Abb.7). Auch Die Calcium-Signale wurden hierbei für 10 min nach Stimulation aufgezeichnet. Da in dieser Zeit keine signifikante Hochregulation der kompletten Transkription und Translation der Proteine stattfindet, ist hierbei vor allem die Basalexpression in den unstimulierten Zellen für die Calcium-Signale ausschlaggebend. Die Versuche zeigten, dass die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im

Vergleich zu den Jurkat- Zellen bei den für die Calcium-Freisetzung wichtigen Proteinen insgesamt ein ähnliches Genexpressionsniveau besaßen, jedoch waren ZAP-70 und Vav bei den Jurkat- Zellen erhöht. Möglicherweise sind diese beiden unter anderem besonders wichtig für eine Aktivierung über antiCD3. Eine erhöhte Empfindlichkeit von Jurkat- Zellen auf antiCD3 wurde bereits beschrieben (Shan et al., 2000). Es ist also denkbar, dass sich durch diese Eigenschaften unterschiedlich starke Calcium- Signalen beim Calcium-Imaging nachweisen lassen.

Insgesamt fällt beim Vergleich der Modellzellen mit den humanen T-Zellen auf, dass bei ersteren die Grundexpressionen aller Proteine vermindert sind. Dennoch ist erkennbar, dass die 58$\alpha^-\beta^-$ -Transfektanten bei Lck, Tec und PLCγ eher höhere Expressionen zeigen, bei Fyn, ZAP-70 und Vav eher geringere, (Abb.11). Die Situation bei den nativen humanen T-Zellen der MS-Kranken stellte sich genau umgekehrt dar: ZAP-70 und Vav waren höher exprimiert, Lck und PLCγ geringer (Abb.13). Präexistente Expressionsdefizite, die Autoimmunität begünstigen, können durch ein Modellsystem nicht aufgedeckt werden, da ja nur der TCR eines MS-Kranken auf Zellen anderen Ursprungs transfiziert wurde. Nur wenn als Folge von einer Aktivierung über diesen TCR Expressionsveränderungen auftreten, kann das in der Modellzelle gezeigt werden. Bei Stimulation fällt auf, dass die 58$\alpha^-\beta^-$- Transfektanten im Vergleich zu den Jurkat- Zellen Tec und vor allem Vav bei antiCD3- Stimulation ähnlich oder höher exprimieren und Fyn und PLCγ eher gering (Abb.11). Bei den MS-Kranken ist ebenfalls Fyn geringer und Tec höher exprimiert als bei den Gesunden (Abb.14).

Um jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen, könnte bei den murinen wie bei den humanen nativen Zellen durch einen Il- 2 Secretion Assay versucht werden, die MBP- sensitiven Zellen anzureichern.

Unter Berücksichtigung der genannten Schwierigkeiten können die BBC-Zellen also als Modell für die Signaltransduktion in nativen T-Zellen dienen. Um die physiologische Stimulation der Modellzellen zu optimieren, könnten zusätzlich Kostimulationen eingesetzt werden. Außerdem könnten durch einen Il-2 Secretion Assay die MBP-sensitiven Zellen herausgefiltert werden, um diese

noch gezielter auf Expressionsunterschiede zu testen. Zur Analyse würde sich neben der real- time RT- PCR besonders die Microarray Technik anbieten. Um die Relevanz der vitro-Befunde für eine in vivo Situation zu erhöhen, könnten ähnliche Versuche mit Splenozyten von EAE-Mäusen und mit humanen T-Zellen MS-Kranker durchgeführt werden.

Insgesamt ist unklar, ob und inwelcher Weise Veränderungen bestimmter Signaltransduktionsmoleküle zu bestimmten Autoimmunerkrankungen prädisponieren. Es wäre dafür eine wichtige, aber noch unbeantwortete Frage, welche Expressionsveränderungen von Signaltransduktionsproteinen, welche Differenzierung von T-Zellen begünstigen. Weiterhin ist klar, dass viele andere noch nicht untersuchte Moleküle bei der Pathogenese von Autoimmunität wichtig sind. Wenn sich Korrelationen von Expressionen bestimmter Proteine zu klinischen oder prognostischen Faktoren bestätigen würden, hätte dies ein großes Potential für viele Anwendungsmöglichkeiten.

Alles in allem würde eine Entwirrung der komplexen Zusammenhänge der T-Zell-Signaltransduktion und der Existenz von Autoimmunität die Entwicklung von therapeutischen Interventionsmöglichkeiten immens fördern.

5. Zusammenfassung

Moleküle der T-Zell-Signaltransduktion sind potentielle Ziele zur Immunmodulation. Eine Störung der T-Zell-Signaltransduktion nach unspezifischer oder Autoantigen-spezifischer Aktivierung könnte die Manifestation einer Autoimmunkrankheit begünstigen.

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von Komponenten der T-Zell-Signaltransduktion untersucht, die eine Schlüsselrolle bei der Calciumfreisetzung spielen. Diese Untersuchungen sind deskriptiv und beschäftigten sich mit der Frage, ob CD4+ T-Lymphozyten von Patienten mit einer Multiplen Sklerose eine Störung der Signaltransduktion aufweisen.

Die Genexpression der an der Signaltransduktion beteiligten Proteinkinasen Fyn, Lck, ZAP-70, Tec und PLCγ sowie die des Adapterproteins Vav wurde mittels real-time RT-PCR untersucht. Der Vergleich zwischen T-Zellen gesunder Probanden und Patienten mit Multipler Sklerose (n=10 pro Gruppe) ließen ein uneinheitliches basales Expressionsmuster erkennen. Bestimmte Stimulationsbedingungen führten bei T-Zellen von Patienten mit einer Multiplen Sklerose zu einer höheren Expression einzelner Parameter. Zur Untersuchung Antigen-spezifischer, CD4+ T-Helferzellen wurden Myelin-spezifische T-Zellen nach Stimulation mit Myelin-Antigenen mittels eines Il-2 Secretion Assay angereichert, ohne dass sich dabei andere Gesichtspunkte ergaben.

Die Verfügbarkeit von zwei Transfektanten (58$\alpha^-\beta^-$-T-Lymphomzellen aus der Maus), die einen transgenen humanen T-Zellrezeptor (TCR) bekannter Spezifität exprimierten, erlaubten eine eingehendere Analyse der aufgeführten Moleküle nach Antigen-spezifischer Stimulation. Die humanen T-Zellrezeptoren stammten aus zwei T Zellklonen eines MS Patienten und erkannten zwei Peptide des basischen Myelinproteins MBP80-99 bzw. MBP139-151.

Die Transfektanten wiesen eine vergleichbare basale Transkriptionsaktivtät wie humane T-Zell-Lymphom-Zellen (Jurkat-Zellen) auf, zeigten aber bei der mitogenen Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper, wie auch in der Kombination mit einem mitogenen und einem kostimulierenden Antikörper (anti-CD3/anti-CD28) eine geringere Erhöhung der Genexpression als die Jurkat-

Zellen. Die Antigen-spezifische Stimulation der Transfektanten mit MBP-Peptiden führte zu Repression aller untersuchten Gene. Die Darstellung der T-Zellaktivierung mittels Calcium–Imaging zeigte bei den Jurkat-Zellen eine stark positive zytoplasmatische Fluoreszenz. Die TCR-Transfektanten wiesen dagegen bei der antiCD3/antiCD28-Doppelstimulation, analog zu den Expressionsanalysen, ein geringeres Calcium-Signal auf.

Diese Pilotuntersuchungen zeigen, dass die Analyse der T-Zell-Signaltransduktion auf der Ebene der Genexpression und der Calcium-Signalmessung für klinische Fragestellungen experimentell zugänglich ist und kann auf weitere Komponenten und Stimulationsparadigmen erweitert werden.

6. Literatur

Abbas,A.K. and Janeway,C.A.Jr. (2000). Immunology: Improving on Nature in the twenty-first century. Cell *100*, 129-138.

Amsen,D. and Kruisbeek,A.M. (1998). Thymocyte selection: not by TCR alone. Immunol. Rev. *165*, 209-229.

Appleby,M.W., Gross,J.A., Cooke,M.P., Levin,S.D., Qian,X., and Perlmutter,R.M. (1992). Defective T-cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. Cell *70*, 751-763.

Bachmaier,K., Krawczyk,C., Kozieradzki,I., Kong,Y.Y., Sasaki,T., Itie,A., Le,J., Ohashi,P.S., Sarosi,I., Nishina,H., Lipkowitz,S., Penninger,J.M. (2000). Nagative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b.

Baier-Bitterlich,G., Uberall,F., Bauer,B., Fresser,F., Wachter,H., Grunicke,H., Utermann,G., Altmann,A., Baier,G. (1996). PKCtheta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T-lymphozytes. Mol. Cell. Biol. *16*, 1842-1850.

Barber,D.F., Bartolome,A., Hernandez,C., Camps,M., Rodriguez,S., Martinez-A.,C., Balomenos,D., Rommel,C., Carrera,A.C. (2005). PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. Nat. Med. *11*; 933-5.

Bolen,J.B. and Brugge,J.S. (2002). Leukozyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. Annu. Rev. Immunol. *15*, 371-404.

Camps,M. Ruckle,T., Ji,H., Ardisonne,V., Rintelen,F., Shaw, J., Ferrandi,C., Chabert,C., Hirsch,E., Wymann,M.P., Cirillo,R., Schwarz, M.K., Rommel,C. (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. Nat. Med. *11*, 936-43.

Cantrell,D. (1998). Lymphozyte signaling: a coordinating role for Vav? Curr. Biol. *8*, 535-538.

Chiang, Y.J., Kole,H.K., Brown,K., Naramura,M., Fukuhara,S., Hu,R.J., Jang,I.K., Gutkind,J.S., Shevach,E., Gu,H. (2000). Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. Nature *403*, 216-20.

Compston,A. (1997). Remyelination in multiple sclerosis: a challenge for therapy. Mult. Scler. *3*, 51-70.

Crespo,M., Bosch,F., Villamor,N., Bellosillo,B., Colomer,D., Rozman,M., Marcé,S., López-Guillermo,A., Campo,E., and Montserrat,E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in CLL. N. Engl. J. Med. *348*, 1764-1775.

Delank,H.W. and Gehlen,W. (2001). Neurologie.

Dustin,M.L. and Chan,A.C. (2000). Signaling Takes Shape in the Immune System. Cell *103*, 283-294.

D´Souza,S.D., Bonetti,B., Balasingam,V., Cashman,N.R., Barker,P.A., Troutt,A.B., Raine,C.S., and Antel,J.P. (1996). Multiple Sclerosis: Fas signaling in oligodendrozyte cell death. J. Exp. Med. *184*, 2361-2370.

Feske,S., Giltnane,J., Dolmetsch,R., Staudt,L.M., and Rao,A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. Nat. Immunol. *2*, 316-324.

Frauwirth,K.A. and Thompson,C.B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. J. Clin. Invest. *109*, 295-299.

Grunebaum,E. and Roifman,C.M. (2001). Signal-Transduction Defects in T cells. Clin. Rev. All. Immu. *20*, 27-39.

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

Igney,F.H. and Krammer,P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat. Rev. Cancer *4*, 277-288.

Janeway,C.A. and Tavers,P. (1997). Immunologie.

Jayaraman,T., Ondrias,K., Ondriasova,E., and Marks,A.R. (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. Science *272*, 1492-1494.

Kane,L.P., Andres,P.G., Howland,K.C., Abbas,A.K., and Weiss,A. (2001). Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of Il-2 and IFN-gamma but not Th2 cytokines. Nat. Immunol. *2*, 37-44.

Koretzky,G. and Myung,P.S. (2001). Positive and negative regulation of T-cell activation by adapter proteins. Nature Rev. Immunol. *1*, 95-107.

Krawczyk,C., Jones,R.G., Atfield,A., Bachmaier,K, Odermatt,B., Ohashi,P.S., Penninger,J.M. (2005). Differential control of CD28-regulated in vivo immunity by E3 ligase Cbl-b. J. Immunol. 174, 1472-8.

Krawczyk,C. and Penninger,J.M. (2001). Molecular controls of antigen receptor clustering and autoimmunity. Trends Cell Biol.

Leo,A., Wienands,J., Baier G., Horejsi V, and Schraven B (2002). Adapters in lymphocyte signaling. J. Clin. Invest. *109*, 301-309.

Lewis C.M., Broussard C., Czar M.J., and Schwartzberg P.M. (2001). Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development. Curr. Opin. Immunol. 317-325.

Lewis,R.S. (2001). Calcium signaling mechanism in T lymphozytes. Anu. Rev. Immunol. *19*, 497-521.

López-Rodríguez,C., Aramburu,J., Jin,L., Rakeman,A.S., Michino,M., and Rao,A. (2001). Bridging the NFAT and NF-kappaB families. Immunity *15*, 47-58.

Lucchinetti,C.F., Bruck,W., Parisi,J., Scheithauer,B., Rodriguez,M., and Lassmann,H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesisof demyelination. Ann. Neurol. *47*, 707-717.

Macián,F., López-Rodríguez,C., and Rao,A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. Oncogene *20*, 2476-2489.

Maehama,T. and Dixon,J.E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. Trends Cell Biol. *9*, 125-128.

Martino,G. and Hartung,H.-P. (1999). Immunopathogenesis of multiple sclerosis: The role of t-cells. Curr. Opin. Neurol. *12*, 309-321.

Moalem,G., Leibowitz-Amit,R., Yoles,E., Mor,F., Cohen,I.R., and Schwartz,M. (1999). Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. Nature Med. *5*, 49-55.

Mustelin,T., Abraham R.T., Rudd C.E., and Alonso A. (2002). Protein tyrosine phosphorylation in T cell signalling. Front. Biosci. *7*, 918-969.

Nervi,S., Atlan-Gepner,C., Kahn-Perles,B., Lecine,P., Vialettes,B., Imbert,J., and Naquet,P. (2000). Specific deficiency of p56lck expression in T lymphozytes from type 1 diabetic patients. J. Immunol. *165*, 5874-5883.

Noseworthy,J.H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. Nature *399*, 40-47.

Noseworthy,J.H., Lucchinetti,C.F., Rodriguez,M., and Weinshenker,B.G. (2000). Medical Progress: Multiple Sclerosis. NEJM *343*, 938-952.

Nossal,G.J.V. (2001). A purgative mastery. Nature *412*, 685-686.

Ohashi,P.S. (2002). T cell signaling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. Nat. Rev. Immunol. *2*, 427-438.

Okamura,H. and Rao,A. (2001). Transcriptional regulation in lymphocytes. Curr. Opin. Cell Biol. *13*, 239-243.

Ouyang,W., Lohning,M., Gao,Z., Assenmacher,M., Ranganath,S., Radbruch,A., and Murphy,K. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs Il4-independent Th2 development and commitment. Immunity *12*, 27-37.

Putney,J.W.Jr. and Ribeiro,C.M.P. (2000). Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic retculum calcium stores. Cell. Mol. Life Sci. *57*, 1272-1286.

Rameh,L. and Cantley,L. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. J. Biol. Chem. *274*, 8347-8350.

Riley,J.L., Mao,M., Kobayashi,S., Biery,M., Burchard,J., Cavet,G., Gregson,B.P., June,C.H., and Linsey,P.S. (2002). Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS and CTLA-4 receptors. PNAS *99*, 11790-11795.

Rohrschneider,L.R., Fuller,J.F., Wolf,I., Liu,Y., and Lucas,D.M. (2000). Structure, function and biology of SHIP proteins. Genes Dev. *14*, 505-520.

Romagnoli,P., Strahan,D., Pelosi,M., Cantragrel,A., and van Meerwijk,J.P.M. (2001). A potential role for protein tyrosine kinase p56lck in rheumatoid arthritis synovial fluid T lymphozyte hyporesponsiveness. Internat. Immunol. *13*, 305-312.

Roose,J. and Weiss,A. (2000). T cells: getting a GRP on Ras. Nat. Immunol. *1*, 275-276.

Roose,J. and Weiss,A. (2003). T cells: getting a GRP on Ras. Nat. Immunol. *1*, 275-276.

Sakaguchi,N., Takahashi,T., Hata,H., Nomura,T., Tagami,T., Matsutani,T., Negishi,I., Nakatsuru,S., Sakaguchi,S. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature *426*, 454-60.

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

Salojin,K., Zhang,J., Cameron,M., Gill,B., Arreaza,G., Ochi,A., and Delovitch,T.L. (1997). Impaired plasma membrane targeting of Grb2-murine son of sevenless (mSOS) complex and differential activation of the Fyn-Tcell receptor (TCR)-zeta-Cbl pathway mediate T cell hyporesponsiveness in autoimmune nonobese diabetic mice. J. Exp. Med. *186*, 887-897.

Schaeffer,E.M. and Schwartzberg,P.L. (2000). Tec family kinases in lymphozyte signalling. Curr. Opin. Immunol. *12*, 282-288.

Sharief,M.K., Noori,M.A., Douglas,M.R., and Semra,Y.K. (2002). Upregulated survivin expression in activated T lymphozytes correlates with disease activity in multiple sclerosis. Europ. J. Neurol. *9*, 503-510.

Sharpe,A.H. and Freeman,G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. Nature *2*, 116-126.

Slifka,M.K. and Whitton,J.L. (2001). Functional avidity maturation of CD8+ T cells without selection of higher affinitiy TCR. Nat. Immunol. *2*, 711-717.

Smith,K.J., Kapoor,R., and Felts,P.A. (1999). Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. Brain Pathol. *9*, 69-92.

Stefanová,I., Hemmer,B., Vergelli,M., Martin,R., Biddison,W.E., and Germain,R.N. (2003). TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-I negative feedback pathways. Nat. Immunol.

Steinmann,L. (1996). Multiple Sclerosis: A Coordinated Immunological Attack against Myelin in the Central Nervous System. Cell *85*, 299-302.

Steinmann,L. (1999). Assessment of Animal Models for MS and Demyelinating Disease in the Design of Rational Therapy. Neuron *24*, 511-514.

Storch,M.K., Piddlesden,S., Haltia,M., Iivanaien,M., Morgan,P., and Lassmann,H. (1998). Multiple Sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. Ann. Neurol. *43*, 465-471.

Sun,Z. and et al. (2000). PKCtheta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature *404*, 402-407.

Szabo,S.J., Kim,S.T., Costa,G.L., Zhang,X., Fathamn,C.G., and Glimcher,L.H. (2000). A novel transcription factor, T-Bet, directs Th1 lineage commitment. Cell *100*, 655-669.

Turner,M. and Billadeau,D.D. (2002). Vav proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. Nature *2*, 476-485.

van Leeuwen,J.E.M. and Samelson,L.E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. Curr. Opin. Immunol. *11*, 242-248.

Vanhaesebroeck,B. and Waterfield,M.D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-Kinases. Exp. Cell Res. *253*, 239-254.

Wange,R.L. (2000). LAT, the linker for activation of T-cells: A bridge between T-Cell specific and general signaling pathways. Science´s stke *63*, 1-13.

Wange,R.L. and Samelson,L.E. (1996). Complex complexes: Signaling at the TCR. Immunity *5*, 197-205.

Ward,S.W. and Cantrell,D. (2001). Phosphoinsitide 3-kinases in T lymphozyte activation. Curr. Opin. Immunol. *13*, 332-338.

Wingerchuck,D.M., Lucchinetti,C.F., and Noseworthy,J.H. (2001). Biology of Disease: Multpile Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. Lab. Invest. *81*, 263-281.

Yong,V.W., Krekoski,C.A., Forsyth,P.A., Bell,R., and Edwards,D.R. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. Trends Neurosci. *21*, 75-80.

Zhang,W., Trible,R.P., and Samelson,L.E. (1998). LAT palmitoylation:its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during t cell activation. Immunity *9*, 239-246.

7. Anhang

Tabelle 9▼: Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in unstimulierten Modellzellen. Die basale RNA-Expression der Proteine wurde mittels real-time RT-PCR bei den Modellzellen BBC, SS8, BBC-CD28 und Jurkat ermittelt. Alle Ergebnisse sind bezogen auf das gleiche Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe. Hier ist der Mittelwert und die Standardabweichung von jeweils drei Experimenten für die Proteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ und Vav aufgelistet.

Protein	Zellen	Basalwert	Standardabweichung
Fyn	BBC	0,050	0,021
	SS8	0,014	0,005
	BBC-CD28	0,025	0,023
	Jurkat	0,062	0,073
	SJL-Maus	0,143	0,136
Lck	BBC	0,148	0,044
	SS8	0,032	0,022
	BBC-CD28	0,098	0,057
	Jurkat	0,151	0,058
	SJL-Maus	0,202	0,192
ZAP-70	BBC	0,316	0,150
	SS8	0,053	0,025
	BBC-CD28	0,245	0,257
	Jurkat	0,556	0,380
	SJL-Maus	0,158	0,148
Tec	BBC	0,515	0,262
	SS8	0,399	0,240
	BBC-CD28	0,355	0,054
	Jurkat	0,051	0,023
	SJL-Maus	5,013	4,994
Plcγ	BBC	0,471	0,377
	SS8	0,063	0,044
	BBC-CD28	0,197	0,067
	Jurkat	0,532	0,367
	SJL-Maus	0,332	0,755
Vav	BBC	0,228	0,116
	SS8	0,087	0,044
	BBC-CD28	0,132	0,059
	Jurkat	0,401	0,214
	SJL-Maus	0,674	0,542

Tabelle 9▼: Genexpression ausgewählter Signaltransduktionsproteine in stimulierten Modellzellen. Die Zellen (58$\alpha^-\beta^-$ -Transfektanten, Jurkat, SJL-Maus-Zellen) wurden 6, 12 und 24 h mit antiCD3 (αCD3), antiCD3/antiCD28 (αCD3/αCD28) oder MBP/DR stimuliert. Die relative Genexpression in den Modellzellen wurde mittels real-time-PCR ermittelt. Alle Ergebnisse sind bezogen auf das gleiche Kontrollgen (18S rRNA) und relativ zu einer humanen T-Zellprobe. Die Genexpressionsverläufe der Hoch- bzw. Runterregulation zu den jeweiligen Zeitpunkten sind bezogen auf 0h. Aufgelistet ist ein repräsentativer Versuch von drei (Nr.2) für die Proteine Fyn, Lck, ZAP-70, Tec, PLCγ und Vav.

Protein	Zellen	Stimulation	6h/0h	12h/0h	24h/0h
Fyn	BBC	antiCD3	0,710	1,591	1,385
	BBC	DR/MBP	0,107	0,460	0,004
	SS8	antiCD3	0,782	0,838	0,740
	BBC-CD28	antiCD3	2,346	2,990	3,918
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	1,490	4,098	3,494
	Jurkat	antiCD3	0,053	9,190	6,453
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	2,657	1,866	24,590
	SJL-Maus	antiCD3	0,091	0,168	0,763
Lck	BBC	antiCD3	0,635	0,768	0,892
	BBC	DR/MBP	0,169	0,514	0,165
	SS8	antiCD3	0,036	1,400	0,722
	BBC-CD28	antiCD3	1,772	2,471	3,605
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	0,979	2,497	4,942
	Jurkat	antiCD3	0,028	3,031	4,740
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	1,338	0,717	10,056
	SJL-Maus	antiCD3	0,044	0,202	1,042
ZAP-70	BBC	antiCD3	0,724	1,419	1,240
	BBC	DR/MBP	0,138	0,418	0,157
	SS8	antiCD3	1,110	1,647	1,042
	BBC-CD28	antiCD3	2,313	3,458	2,732
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	1,173	2,949	3,811
	Jurkat	antiCD3	3,864	3,784	6,021
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	1,283	0,821	11,275
	SJL-Maus	antiCD3	0,100	0,372	2,321
Tec	BBC	antiCD3	0,443	0,332	0,832
	BBC	DR/MBP	0,110	0,391	0,284
	SS8	antiCD3	0,220	0,253	0,176
	BBC-CD28	antiCD3	0,511	0,901	3,204
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	0,415	1,021	2,761
	Jurkat	antiCD3	0,380	4,691	4,084
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	0,465	0,336	7,972
	SJL-Maus	antiCD3	0,034	0,149	0,465
PLCγ	BBC	antiCD3	0,284	0,324	0,914
	BBC	DR/MBP	0,078	0,319	0,045
	SS8	antiCD3	0,532	0,626	0,824
	BBC-CD28	antiCD3	0,648	1,315	2,630
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	0,363	1,301	1,959
	Jurkat	antiCD3	0,355	2,676	5,445
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	0,657	0,460	1,993
	SJL-Maus	antiCD3	0,023	0,099	0,599

Vav	BBC	antiCD3	0,467	0,702	1,169
	BBC	DR/MBP	0,146	0,304	0,173
	SS8	antiCD3	0,476	1,454	0,370
	BBC-CD28	antiCD3	1,676	1,925	2,181
	BBC-CD28	antiCD3 + antiCD28	0,889	2,362	3,364
	Jurkat	antiCD3	0,865	3,446	3,117
	Jurkat	antiCD3 + antiCD28	0,787	0,475	1,083
	SJL-Maus	antiCD3	0,111	0,304	16,507

8. Abkürzungen

ADCC	antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Cop	Copolymer
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Encephylomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GEF	Guanin-Nucleotid-Exchange Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage –Colony Stimulating Factor
Grb2	Growth Factor Receptor-Bound Protein2
ICAM-1	intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IP3	Inositol1,4,5-triphosphat
ITAMs	immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

Itk	Inducible T-Cell Kinase
JNK	c-Jun-Kinase
LAT	Linker For Activation Of T-Cells
LPS	Lipopolysaccharide
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MAP-Kinase	Mitogen activated protein Kinase
MBP	Myelin Basisches Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NFAT	Nuclear Factor For Activated T-Cells
PBMC	peripheral blood monocytes
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
$PI(3,4,5)P_3$	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI3K	Phosphatidylinositol–3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
$PLC\gamma$	Phospholipase C gamma
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PTK	Proteintyrosinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIP	SH2-containing inositol phosphate 5-phosphatase
SLP-76	SH2-containing leukocyte protein 76
SOS	Son of sevenless-GEF
ST	Signaltransduktion
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
ZAP-70	Zeta Associated Proteintyrosinkinase-70

9. Danksagung

Vielen Dank

Herrn Professor Dr. Melms für die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt unter guten Bedingungen arbeiten zu dürfen.

Herrn Professor Dr. Wiendl und Herrn Dr. Brock für die sehr gute Betreuung.

Herrn Dr. Mehling für die Überlassung der Spenderproben und Herrn Dr. Bischoff für die Bereitstellung der SJL-Mäuse.

Herrn Professor Selbmann für die statistische Auswertung.

Der gesamten AG Wiendl und Brock für die vielfältige Hilfe bei meiner Arbeit. Besonders danken möchte ich Frederik, für seine wertvolle wissenschaftliche und menschliche Unterstützung im Rahmen der gesamten Arbeit. Großer Dank auch an Markus für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Diese Doktorarbeit möchte ich meinen Eltern widmen, die mich während meiner gesamten Ausbildung immer uneingeschränkt unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Annette Igney	
geboren am:	04.07.79 in Böblingen
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Ausbildung

1986-90	Ludwig-Uhland Grundschule Gärtringen
1990-99	Andreae-Gymnasium Herrenberg, Abitur 09/99
1999-2005	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
09.2001	Ärztliche Vorprüfung
09.2002	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung (1.Staatsexamen)
09.2004	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung (2.Staatsexamen)
2004-2005	Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus Sindelfingen sowie an der Universität Zürich, Spital Wetzikon, Schweiz
30.11.2005	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung (3.Staatsexamen) Gesamtnote: sehr gut
2003-2006	Doktorarbeit in der Neurologie am Interfakultären Institut für Zellbiologie sowie am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung der Universität Tübingen, Abt.: Experimentelle Neuroimmunologie