Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ)

DISSERTATION

D-Aminosäuren-substituierte Peptidepitope induzieren T-Zell-Toleranz *in vivo*

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Johannes Falk
aus Marburg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr. T. Kamradt

2. Prof. Dr. C. Baerwald

3. Prof. Dr. O. Liesenfeld

Datum der Promotion: 07.08.2003

Zusammenfassung:
In dieser Arbeit wurde die Induktion spezifischer, immunologischer T-Zelltoleranz als therapeutische Strategie bei Autoimmunerkrankungen im Mausmodell untersucht. Da davon ausgegangen werden muss, dass viele der Autoimmunkrankheiten durch T-Zellen vermittelt sind, ist die Induktion spezifischer T-Zelltoleranz eine besonders interessante Therapiestrategie.
Spezifische T-Zelltoleranz kann mittels Injektion des entsprechenden Peptidantigens induziert werden. Insgesamt sind zur Induktion einer solchen Toleranz, zumindest beim Menschen, relativ hohe Dosen an Peptidantigen notwendig. Die Produktion dieser Peptidantigene ist teuer. Bei unvorsichtiger Gabe kann es zur Anaphylaxie kommen. Es sollte also von Vorteil sein, die zu applizierende Menge an Peptid möglichst gering, dabei aber effizient zu halten. Vermutlich werden Antigene in Form von Peptiden schnell von unspezifischen Peptidasen und Proteasen in nicht-immunogene Fragmente gespalten und ausgeschieden, was wiederum eine hohe Dosierung erforderlich macht.
Im Anfang der vorliegenden Arbeit stand die Hypothese, dass eine Stabilisierung des zu applizierenden Antigens zum Schutz vor Fragmentierung (und damit Wirkungsverlust) eine geeignete Methode sein könnte, Toleranzinduktion effektiver bzw. kostengünstiger zu gestalten.
Bezüglich einer Stabilisierung von Peptiden zeigte sich, dass Peptide, welche aus rechtsdrehenden (D-)Aminosäuren zusammengesetzt sind, nur verzögert durch Proteasen/Peptidasen abgebaut werden. Wir setzten deshalb in dieser Arbeit D-Aninosäuren-substituierte Peptid-Varianten des Ovalbumin$_{323-339}$-Peptidepitops (OVA$_{323-339}$) ein und betrachteten die Wirkung dieser Peptide *in vitro* sowie *in vivo* auf spezifische DO11.10 T-Zellen.
Basierend auf dem Peptidantigen OVA$_{323-339}$, wurde zunächst ein minimales Epitop definiert, welches bei etwa gleicher Potenz um 6 Aminosäuren verkürzt werden konnte. Anschließend wurde eine Substitutionsanalyse durchgeführt, in der die ursprüngliche Aminosäuresequenz durch Austausch einiger L-Aminosäuren mittels D-Aminosäuren verändert wurde. Diese neu synthetisierten Peptide wurden zunächst auf ihre Fähigkeit überprüft, die OVA$_{323-339}$ spezifischen DO11.10 T-Zellen *in vitro* zu aktivieren. Parallel konnte gezeigt werden, dass diese synthetisierten Peptidepitope *in vitro* eine deutlich verlängerte Serumhalbwertszeit aufwiesen.
Im Weiteren wurde versucht, durch systemische Injektion von 300µg D-Peptid-Varianten in BABLB/c Mäusen T-Zelltoleranz zu induzieren. Die *ex vivo* restimulierten Lymphknoten-Zellen dieser Mäuse präsentierten je nach appliziertem Peptid eine reduzierte Proliferationsbereitschaft und IL-2 Sekretion. Die hier induzierte Toleranz konnte bis zu 60 Tagen post injectionem sowohl für das OVA$_{323-339}$ als auch für einige der eingesetzten D-Peptide nachgewiesen werden. Auch nach Reduktion der Peptiddosis auf nur 100µg/Maus, waren die verkürzten und D-Aminosäuren-substituierten Peptide immer noch in der Lage sicher Toleranz zu induzieren. Die induzierte Toleranz durch D-Peptide war dabei der durch das Ausgangspeptid OVA$_{323-339}$ induzierten Toleranz vergleichbar stark.
Mit der Hilfe eines Transfermodells in unmanipulierte Mäuse, wurde das Verhalten der spezifischen T-Zellpopulation *in vivo* beobachtet. Durch den Transfer konnten in den Empfängermäusen (Balb/c) definierte T-Zellpopulationen bekannter Größe erzeugt werden. Mit dem Antikörper KJ1-26.1, der spezifisch den DO11.10-T-Zellrezeptor erkennt, konnten die transferierten Zellen in Geweben der Empfängermaus per FACS-Analyse nachgewiesen und deren Verhalten *ex vivo* studiert

werden. Die intravenöse Injektion der serumstabilisierten Peptidanaloge führte in den transferierten Mäusen je nach Peptid zu einer funktionellen Nichtreaktivität (Anergie) als auch zur Deletion der für das Ausgangs(L-)Peptid spezifischen DO11.10 T-Zellen.
In den oben genannten Versuchen ergaben sich Hinweise dafür, dass die D-Peptide ebenso effektiv sind wie das wesentlich längere Ausgangspeptid $OVA_{323-339}$. Zukünftige Experimente werden weitere Aufschlüsse über einen möglichen Vorteil des Einsatzes von D-Peptiden in der Toleranzinduktion erbringen.

Schlagworte:
Periphere T-Zelltoleranz, Toleranzinduktion, Anergie, D-Peptide, Ovalbumin, OVA323-339, DO11.10, alterierte Peptidepitope, Peptidstabilität, Autoimmunität

Abstract:
D-amino acid substituted OVA323-339-variants induce long lasting T cell tolerance in vivo
Induction of antigen-specific peripheral T cell tolerance in autoimmune diseases is an interesting therapeutically strategy. It can be induced by systemic injection of high-dose antigen. Investigations in induction of peripheral T cell tolerance in autoimmune mouse models revealed promising results. But it was also shown that the induced T cell tolerance spontaneously reverses after a period of time. This is probably due to a short in vivo half-life of the administrated peptide antigens. Since durable tolerance is required for this strategy to be of therapeutic value the administrated antigen-dose has to be of a very high and has to be injected repeatedly, and therefore bears an increased risk of anaphylactic reactions or exacerbation of the autoimmune disease. Because of these restrictions and also the high costs of peptide-production and purification, it is not surprising that this therapy didn't really find its way in to the clinical practice. The discovery that Peptides assembled partly or totally from D-amino acids are much more stable to proteolysis then natural L-peptides and therefore show an increased stability, lead to a wide interest of pharmacologists and immunologists. In former investigations it was shown that D-peptides used as vaccines elicited high levels of neutralizing antibodies so that there is no doubt about their immunogenic potency in vivo. It is also known that a single T cell receptor recognizes a wide range of peptide analogues that closely mimic the natural antigen. These observations led to our hypothesis, that the induction of peripheral T cell tolerance by systemic administration of D-Peptide substituted antigen variants should be possible and could be much more effective than the induction by the wild-type L-peptide. To verify our hypothesis we have chosen the well known OVA323-339 antigen which is recognized by T cells through the presentation in the I-Ad context. In a first step we performed a truncation analysis of OVA323-339 to identify a minimal epitope in it. We were able to demonstrate that the sequence OVA327-337 is as well potent as the original and 6 amino acids longer OVA323-339 sequence. The potency of new defined epitopes was tested by stimulating the OVA323-339 -specific DO11.10 T cells in vitro. In a stepwise performed substitution analysis we attempted to insert some D-amino acids in this novel peptide epitope. The DO11.10 cells only tolerated a few D-amino acid substitutions into the original sequence with the effect of now showing reduced proliferation. Performing an analysis of their half-life in vitro we identified two peptides as interesting candidates for the in vivo tolerance induction experiments. In the in vivo part of this work we induced peripheral tolerance by injecting the novel peptides into BALB/c mice. To monitor the behaviour of the tolerated T cells we also performed

adoptive transfer experiments by transferring DO11.10 cells into naive BALB/c mice. With the help of the KJ26-1 antibody which specifically recognizes the DO11.10 T cell receptor it became possible to detect the transferred T cells ex vivo. Our results demonstrate that induction of peripheral T cell tolerance through injection of D-peptides is possible and long lasting (up to 60 days). Even with a dose reduction we found a stable T cell tolerance under ex vivo restimulation with the original peptide. Summarizing we were able to show that D-peptides are at least as effective as the natural occurring L-peptides inducing tolerance. Much more, the transfer experiments revealed that the kind of induced T cell tolerance (i.e. anergy and/or deletion through activation induced cell death) is antigen dependent and probably differs due to the agonistic potency of the given antigen.

Keywords:
Peripheral t cell tolerance, tolerance, Anergy, Autoimmunity, altered peptide ligands, D-peptides, D-amino acids, OVA323-339, Ovalbumin, DO11.10,

meinen Eltern,
meiner Schwester

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis 6

2 Einführung 8

2.1 Das Immunsystem, die Autoimmunität 9
2.2 T-Zellen 10
2.3 T-Zell-Aktivierung 11
2.3.1 Antigen Erkennung durch T-Zellen 11
2.4 T-Zell-Aktivierung 12
2.5 Immunologische Toleranz 15
2.5.1 Zentrale Toleranzinduktion im Thymus 15
2.5.2 Periphere Toleranzinduktion 15
2.5.2.1 Periphere Deletion von T-Zellen/ Klonale Deletion 16
2.5.2.2 Anergie 16
2.5.2.3 Suppression durch regulatorische Zytokine 17
2.5.2.4 Immunologische Ignoranz 18
2.6 Verlust von T-Zell-Toleranz und Entwicklung von Autoimmunität 19
2.7 (Wieder-) Herstellung von T-Zell-Toleranz 21
2.7.1 Induktion immunologischer Toleranz durch Applikation von Antigen 21
2.8 Modelle zur Untersuchung peripherer T-Zell-Toleranz 22
2.9 Induktion peripherer Toleranz durch alterierte Peptidantigene 24
2.10 Zielsetzung 25

3 Material 26

3.1 Mäuse 26
3.2 Reagentien und Chemikalien 26
3.3 Puffer und Zellkulturmedien 27
3.3.1 Puffer 27
3.3.2 Medien 28
3.4 Zytokine, Antikörper und synthetische Peptide 28
3.4.1 Antikörper und Zytokine 28
3.4.1.1 Antikörper und Zytokine für ELISA 28
3.4.1.2 Antikörper für FACS-Analyse 28
3.4.2 Synthetische Peptide 29
3.5 Geräte 30

4 Methoden 31

4.1 Tierversuche 31
4.1.1 i.v. Peptidinjektion 31
4.1.2 s.c. Peptideinjektionen (Immunisierung) 31
4.1.3 i.v. Adoptiv Transfer von DO11.10-Mausmilzzellen 31
4.1.4 Tötung von Versuchtieren 31
4.1.5 Entnahme von Geweben aus Versuchtieren 31
4.2 Zellbiologische Methoden 32
4.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Lymphorganen 32
4.2.2 Kultivierung von Lymphozyten aus Lymphorganen 32
4.2.2.1 Zählen von Zellen 32
4.2.2.2 Eingesetzte Zellkonzentrationen 32
4.2.2.3 *In vitro* Peptidkonzentrationen und unspezifische Stimulation 33
4.2.2.4 Kulturbedingungen 33
4.2.2.5 Überstände zur Zytokinbestimmung, Zellernte, Proliferationsmessung 33
4.3 Testsysteme 33
4.3.1 Messung der *in vitro* Serumstabilität der Peptide 33
4.3.2 Peptid Schnelltests (Screening) 34
4.3.3 Versuchsablauf Toleranzinduktion 34
4.3.4 CTLL-2 / IL-2 Bioassay 35
4.3.5 Zytokin -ELISA 35

4.3.6 Präsentation der Graphiken ... 36
4.3.7 Festlegung der Toleranzkriterien ... 36
4.3.8 FACS-Analyse mit Durchflußcytometrie ... 37
4.3.8.1 Prinzip und Durchführung ... 37
4.3.9 Oberflächenfärbung ... 39
4.4 Statistik ... 39

5 Ergebnisse ... 40

5.1 *In vitro* Versuche ... 40
5.1.1 $OVA_{327-337}$ ist ein potentes minimales Epitop am DO11.10 T-Zellrezeptor ... 40
5.1.2 *In vitro* Wirkung von ausgewählten D-Peptiden auf DO11.10 Zellen ... 44
5.1.3 Die *in vitro* Serumstabilität der D-Peptidepitope zeigt sich in einer deutlich verlängerten Serumhalbwertszeit ... 46
5.2 *In vivo* Versuche ... 47
5.2.1 Das minimale Epitop $OVA_{327-337}$ induziert immunologische Toleranz gegenüber $OVA_{323-339}$ *in vivo* 47
5.2.2 Induktion peripherer Toleranz mittels D-Peptid-Epitope ... 48
5.2.3 Beobachtung der induzierten Toleranz über die Zeit ... 50
5.2.3.1 Toleranz 40 Tage post i.v. ... 50
5.2.3.2 Toleranz 60 Tage post i.v. ... 52
5.2.4 Beobachtung der induzierten Toleranz bei Dosisreduktion ... 54
5.2.5 Visualisierung der Toleranzinduktion ... 56
5.2.5.1 Erläuterung zur Adoptiv-Transfer-Methode ... 56
5.2.5.2 Beispielhafte FACS-Analysen ... 57
5.2.6 Toleranzinduktion im Adoptiv-Transfer-System ... 59

6 Diskussion ... 64

6.1 Der DO11.10 T-Zellrezeptor erkennt auch verkürzte OVA-Varianten ... 64
6.2 D-Aminosäuren-substituierte Peptide werden vom DO11.10 T-Zellrezeptor erkannt ... 65
6.3 D-Aminosäuren-substituierte Peptide weisen eine deutlich verlängerte *in vitro* Serumhalbwertszeit auf 67
6.4 D-Aminosäure substituierte OVA –Varianten induzieren periphere Toleranz ... 69
6.5 Stabile Toleranzinduktion trotz Dosisreduktion ... 73
6.6 Die induzierte Toleranz hält mindestens bis zu 60 Tage an ... 74
6.7 Weitere Überlegungen ... 75

7 Danksagung ... 77

8 Abkürzungsverzeichnis ... 78

9 Literaturverzeichnis ... 80

10 Anhang ... 87

10.1 Abkürzungen und Molekulargewichte für Aminosäuren ... 87

11 Erklärung an Eides statt ... 88

2 Einführung

In dieser Arbeit soll auf die Induktion antigenspezifischer, immunologischer T-Zell-Toleranz als therapeutische Strategie näher eingegangen werden. Diese Methode bedient sich natürlicher immunologischer Mechanismen und nutzt diese zur gezielten Suppression der autoimmunen Reaktion. Viele der Autoimmunkrankheiten werden durch T-Zellen vermittelt, somit ist die Induktion bzw. die Re-Induktion von T-Zelltoleranz eine besonders interessante Therapiestrategie.

T-Zelltoleranz kann unter anderem durch systemische Gabe (z.B. intravenöse Injektion) von löslichem Antigen erzielt werden. Nach erfolgter Aktivierung und klonaler Expansion verringert sich anschließend die Anzahl der betroffenen T-Zellen und die zurückbleibenden Zellen sind nicht mehr in der Lage, bei erneuter Konfrontation mit dem spezifischen Antigen eine Abwehrreaktion zu initiieren (Kyburz 1993 [1], Kearny 1994 [2], Falb 1996 [3]). Dieses Verhalten wird als Toleranz bezeichnet. In diesem Fall zeigen die für das Antigen spezifischen Zellen ein tolerantes Verhalten gegenüber ihrem Antigen, im Falle von Autoimmunität eine Toleranz gegenüber dem Autoantigen. Dies kann zum Beispiel zu einem Rückgang der Krankheitsaktivität im Falle einer Autoimmunerkrankung führen.

Es darf nicht verwundern, dass diese Methode in der Therapie von Autoimmunerkrankungen noch nicht etabliert ist, obwohl erste Studien z.B. an multipler Sklerose (MS) erkrankten Patienten bereits Erfolge zeigten (Warren 1997 [4]). Zunächst muss das betreffende Autoantigen bekannt sein, seine Synthese kostengünstig sowie die therapeutische Applikation effektiv und weitestgehend risikofrei sein. Insgesamt sind zur Induktion einer solchen Toleranz beim Menschen unterschiedlich hohe Dosen Antigen notwendig. Im Gegensatz zu einer Desensibilisierung werden hier relativ hohe Dosen notwendig, um einen akuten Effekt zu erzielen. Die Produktion dieser Antigene (in der Regel Proteine bzw. Peptide) ist teuer. Die parenterale Gabe von Peptiden kann weiterhin zur Anaphylaxie führen, ebenso sind akute Exazerbationen der Autoimmunkrankheit möglich und beim Menschen häufig beobachtet worden (Bielekova 2000 [5], Übersicht in Kamradt 2001 [6]).

Der Einsatz von hohen Dosen an Antigen ist vermutlich auch deshalb notwendig, weil Antigene in Form von Peptiden schnell von unspezifischen Proteasen und anderen Enzymen, wie sie in den meisten Geweben und Seren tierischer Körper vorkommen, in nichtimmunogene Fragmente gespalten und ausgeschieden werden. Hiermit vermindern sich einerseits die Halbwertszeit und die Zirkulationshäufigkeit im Organismus (und damit die Kontaktwahrscheinlichkeit von Antigen und T-Zelle), andererseits nimmt die Immunogenität (für das Immunsystem nicht

erkennbare Fragmente) der Antigene ab. Im Anfang der vorliegenden Arbeit stand die Hypothese, dass eine Stabilisierung des zu applizierenden Peptidantigens zum Schutz vor Fragmentierung (und damit vor Wirkungsverlust) eine geeignete Methode sein könnte, Toleranzinduktion effektiver, bzw. kostengünstiger zu gestalten.
Bezüglich einer Stabilisierung von Peptiden zeigte sich, dass Peptide, welche aus rechtsdrehenden Aminosäuren (D-Aminosäuren, D-AS) zusammengesetzt sind oder diese beinhalten (D-Peptide), nur verzögert von den meisten tierischen Proteasen abgebaut werden. Experimente, in denen diese stabilisierten D-Peptide als Impfsubstanz eingesetzt wurden, erbrachten interessanterweise im Vergleich erhöhte Antikörpertiter in den geimpften Tieren (Benkirane 1996 [7], Übersicht Regenmortel 1998 [8]). Das zeigt, dass besagte Peptide von Immunzellen erkannt werden, und zu einer Aktivierung von z.B. spezifischen T-Zellen führen können und ggf. stärker immunogen wirken als linksdrehende (L-) Peptide.
T-Zellrezeptoren sind nur „relativ“ spezifisch für ihr Antigen und können durchaus mehrere, in der Regel strukturverwandte Antigene erkennen. Spezifischen T-Zellen ist es so ggf. auch möglich strukturverwandte D-Peptide zu erkennen. Es sollte deshalb möglich sein, Toleranz bezüglich eines bekannten (Auto-)Antigens auch mit (ggf. strukturähnlichen) D-Aminosäuren-substituierten Peptiden zu induzieren.
Zur Untersuchung unserer Hypothese wählten wir ein bekanntes Mausmodell, um erstmals T-Zelltoleranz mit Hilfe von D-Peptiden zu induzieren. Dabei waren wir daran interessiert, Unterschiede zwischen konventionell induzierter (L-Peptid) und D-Peptid induzierter T-Zelltoleranz aufzudecken um letztlich Vorzüge oder Nachteile der Toleranzinduktion mit D-Peptiden zu beschreiben.

2.1 Das Immunsystem, die Autoimmunität

Das gesunde Immunsystem der Vertebraten ist in der Regel dazu befähigt, das Eindringen und die Ausbreitung von Krankheitserregern wirksam zu unterbinden. Das Immunsystem ist ein Netzwerk von Zellen, das letztendlich auf jedes nur erdenkliche Molekül reagieren kann. Diese Moleküle können prinzipiell auch körpereigene Moleküle sein. Die Frage, wie es dem Immunsystem möglich ist, zwischen potentiell gefährlichen Strukturen und harmlosen (z.B. eigenen) zu differenzieren, ist nicht vollständig geklärt.
Autoreaktive Immunzellen lassen sich auch in gesunden Individuen nachweisen (Naquet 1988 [9], Kitze 1988 [10]). Zum Ausbruch einer Autoimmunerkrankung kommt es in der Regel jedoch nicht. Offensichtlich werden diese Zellen durch das Immunsystem im Sinne des Individuums günstig beeinflusst (kontrolliert). Eine Autoimmunkrankheit entsteht erst dann, wenn die

Toleranz gegenüber organismuseigenen Strukturen durchbrochen wird und diese Aktion nicht eingedämmt werden kann. Das Immunsystem ist als Netzwerk zu begreifen, in dem die beteiligten Zellen durch die Interaktion untereinander ihre "zerstörerische Potenz" im Zaum halten und nur dann entfalten, wenn Gefahr hinsichtlich der Integrität des Organismus besteht. Es scheint, dass die Toleranz gegenüber eigenen Strukturen ein zentraler und aktiver Vorgang von höchster Bedeutung ist.

Die Störung der Eigentoleranz kann ohne Folgen bleiben, vorübergehen oder sich in Form chronischer Krankheit etablieren. Von klinischer Bedeutung ist, ob das Autoantigen organspezifisch exprimiert wird oder ubiquitär vorkommt. Die Erkrankung kann sich demnach organspezifisch oder systemisch manifestieren. Organspezifisch zeigt sich z.B. der Diabetes mellitus (Typ IDDM), systemisch z.B. der systemische Lupus erythematodes (SLE). Systemische Erscheinungen treten aber auch dann auf, wenn das eigentliche Antigen organspezifisch sezerniert wird. In diesem Fall können exzessiv gebildete Immunkomplexe (z.B. Komplexe aus Antigen und Antikörpern) in der Peripherie abgelagert werden und dann lokal weitere immunologische Reaktionen verursachen. Ebenso können ubiquitär vorkommende Antigene nur zu einer lokalen (organspezifischen) Erkrankung führen. So unterschiedlich autoimmune Erkrankungen auch in Erscheinung treten, ihnen allen ist die chronische Entzündungs-/Immunreaktion gemeinsam.

Die Pathogenese primärer, autoimmuner Erkrankungen ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es bestehen Risikofaktoren, in deren Zusammenspiel gehäuft Autoimmunopathien auftreten: Zu nennen sind die positive Familienanamnese, das Geschlecht, Alter, und insbesondere bestimmte HLA Typen (Allele). Para- oder postinfektiöse Autoimmunphänomene werden unter anderem durch Kreuzreaktivität erklärt (engl. molecular mimikry). Weiterhin können bakterielle Superantigene eine große Anzahl von Immunzellen gleichzeitig aktivieren.

Häufig initiieren und/oder unterhalten T-Zellen die autoimmunologische Reaktion. Aus therapeutischen Gesichtspunkten ist die Wiederherstellung von T-Zelltoleranz daher eine interessante Alternative in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen.

Im Folgenden soll näher auf die T-Zellen, ihre Charakterisierung und Aktivierung eingegangen werden, um anschließend T-Zelltoleranz und deren experimentelle Induktion zu besprechen.

2.2 T-Zellen

T-Zellen werden anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle in zwei Klassen unterteilt. Es handelt sich um die $CD4^+$- (CD4-positiv) und die $CD8^+$-T-Zellen. Eine große Anzahl membranständiger Glycoproteine ist mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bestimmt worden und wurde nach einer konventionellen internationalen Nomenklatur CD (engl.: cluster of

differentiation) benannt und nummeriert. Ein kleiner Teil der T-Zellen, die $CD8^+$-T-Zellen, zu denen cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zählen, gehört zu den Effektor-Zellen. Sie können sich direkt an der Zerstörung von Krankheitserregern beteiligen. $CD4^+$-T-Zellen (T-Helferzellen, Th-Zellen) sind regulatorische Zellen, deren Botenstoffe (Zytokine) die Effektorfunktion der B-Zellen und CTL regulieren bzw. unterstützen. Den $CD4^+$-T-Helferzellen kommt daher eine besondere Rolle in der Induktion und Unterhaltung einer Immunantwort, sowie in deren Regulation zu.

2.3 T-Zell-Aktivierung

2.3.1 Antigen Erkennung durch T-Zellen

T-Zellen erkennen Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR). T-Zellen, welche denselben T-Zellrezeptor tragen, werden einem Klon zugeordnet. Jeder T-Zellklon verfügt damit über seinen eigenen Rezeptor, welcher in identischen Kopien auf der Oberfläche der dem Klon angehörigen Zellen exprimiert wird. Über den T-Zellrezeptor werden ausschließlich solche Antigene erkannt, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex, kurz MHC) gebunden sind.

Der T-Zellrezeptor auf der Mehrheit der T-Zellen ist ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Polypeptidkette. Jede Kette des Heterodimers ist ein integrales Membranprotein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und zwei extrazellulären, immunglobulinähnlichen Domänen, die an der Bindung von MHC und Peptid beteiligt sind.

Es werden (grob) zwei Formen von MHC- Molekülen unterschieden. Das MHC Klasse I–Molekül (MHC I), welches nahezu auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert wird, und das MHC Klasse II-Molekül (MHC II), welches nur auf der Oberfläche von spezialisierten Antigen präsentierenden Zellen (APC) zu finden ist. Zu den Antigen präsentierenden Zellen zählen z.B. Makrophagen, dendritische Zellen, aber auch die B-Zellen.

Auf MHC I werden Moleküle (Peptide) aus der endogenen Produktion einer Zelle präsentiert. Ist eine Zelle durch einen Virus infiziert, können auch Antigene aus der Virusreplikation bzw. Virussynthese präsentiert werden. Auf MHC II-Molekülen werden üblicherweise Peptide präsentiert, welche von der Antigen präsentierenden Zelle aus der Umgebung aufgenommen und prozessiert wurden.Während $CD4^+$ T-Zellen Antigene auf MHC II Molekülen erkennen, sind $CD8^+$-T-Zellen auf die Präsentation des Antigen im MHC I Kontext angewiesen (Germain 1994 [11]). In der Regel handelt es sich bei den präsentierten Antigenen um prozessierte Peptide in einer Länge von 9 bis 15 Aminosäuren (AS)(Germain 1994 [11]). (Siehe Abbildung 2.2). Die

MHC-Gene sind hochpolymorph. Die Loci werden beim Menschen HLA (engl.: Human Leucocyte Antigens) und bei der Maus H-2 (für Histokompatibilität) genannt. Bei der Maus sind A und E die beiden Klasse-II-Loci, K und D sind die funktionellen Klasse-I-Loci. Mit kleinen hochgestellten Buchstaben werden bestimmte Allelkombinationen bezeichnet.

2.4 T-Zell-Aktivierung

Die naive T-Zelle wird nach Antigenkontakt als aktivierte T-Zelle oder auch als Effektor-Zelle bezeichnet. Bedingungen für die Aktivierung einer $CD4^+$ T-Zelle sind:

1. Die Erkennung des jeweiligen Antigens durch den entsprechend spezifischen T-Zellrezeptor (Signal 1) und
2. Das Erhalten eines costimulatorischen Signals durch die präsentierende Zelle (Signal 2) (siehe auch Abbildung 2.2).

Zur Costimulation stehen der T-Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung. Gut untersucht und vermutlich auch einer der wichtigsten Mechanismen ist beispielsweise die Costimulation über den CD28-Rezeptor mittels B-7. T-Zellen besitzen hierfür den Rezeptor CD 28, welcher durch B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) aktiviert werden kann. B7-1 und B7-2 befinden sich auf der Zellmembran der APC (Chambers 1999 [12], Watts 1999 [13]) (siehe Abbildung 2.2).

Für die Weiterleitung des Antigensignals in den cytoplasmatischen Raum der T-Zelle ist der T-Zellrezeptor mit CD3 assoziiert. Außerdem kooperieren die Corezeptormoleküle $CD4^+$ und $CD8^+$ bei der Antigenerkennung mit dem T-Zellrezeptor und wirken stabilisierend, indem sie ebenfalls an das MHC-Molekül binden. Die Abbildung 2.1 zeigt schematisch den T-Zellrezeptor/CD3- Komplex, die Abbildung 2.2 zusätzlich die Bindung von B7 an CD 28. Der Kontakt des T-Zellrezeptor/CD3-Komplexes im MHC-Kontext an ein Peptidantigen führt zur Aktivierung verschiedener assoziierter Tyrosinkinasen, die ihrerseits nachgeschaltete Effektorproteine phosphorylieren und aktivieren (Weiss 1993 [14]; Fields und Mariuzza 1996 [15]). Dies führt zu der Expression von Zytokinrezeptoren (innerhalb von 2-6h), der Sekretion von Zytokinen (innerhalb von 6-24h), der Initiation der DNA-Replikation (innerhalb von 24h), der Zellteilung (innerhalb von 48h) und dem Erwerb eines veränderten Differenzierungscharakters (im Laufe von Tagen) (Crabtree 1989 [16]; Weiss und Littman 1994 [17]). Als eines der ersten Zytokine wird das proliferativ wirkende Interleukin-2 (IL-2) sezerniert.

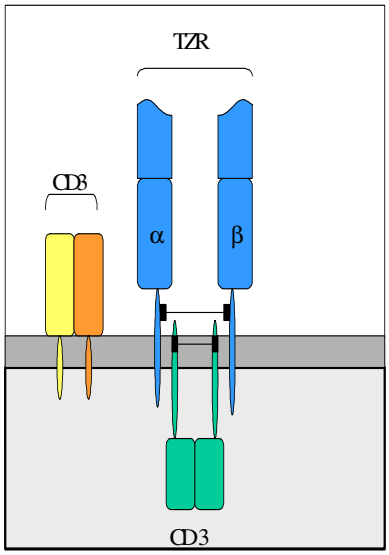

Abbildung 2.1: **Schematische Darstellung des T-Zellrezeptor/CD3-Komplexes;**
nach Charles A. Janeway und Paul Travers, Immunologie, S.197, Spektrumverlag 1995,
Abbildung vereinfacht dargestellt. Der T-Zell-Rezeptor auf der Mehrheit der T-Zellen ist ein Heterodimer aus je einer hochvariablen α- und β- Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden und im Komplex mit dem CD3-Heterodimer und dem CD3-Homodimer in die Zellmembran eingelagert sind. Der α/β-T-Zellrezeptor erkennt das Antigen. Die CD3-Ketten signalisieren ins Innere der Zelle, dass eine Antigenbindung stattgefunden hat.

Anhand der Reaktion aktivierter $CD4^+$-T-Zelle lässt sich eine Th1- und eine Th2-Subpopulation unterteilen. Die Unterteilung geschieht anhand der Zytokinsekretion, bzw. des Zytokinsekretionsmusters (Mosmann 1991 [18]). Th1-Zytokine sind IL-2, Interferon-γ (IFN-γ) und Tumor-Nekrose-Faktor-β (TNF-β) (Mosmann 1989 [19]). Hier handelt es sich hauptsächlich um proinflammatorische Zytokine, die Makrophagen aktivieren und die zellvermittelte Immunität unterstützen (Bottomly, 1988 [20]). Th2-Zytokine sind IL-4, IL-5 und IL-13 (Minty 1993 [21]). Sie aktivieren B-Zellen zum Immunglobulin (Ig) Klassenwechsel und zur Antikörpersekretion und regulieren die humorale Immunantwort. Außerdem regulieren sie die Produktion von Mastzellen, die Proliferation und Differenzierung von Eosinophilen und die IgA-Synthese und spielen so eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen (Romagnani, 1994 [22]).

Nicht nur die Antwort auf eine antigene Stimulierung ist unterschiedlich zwischen den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. Auch die Art und Weise der Immunantwort einer T-Zelle einer gegebenen Subpopulation ist vom exakten Kontext der Antigenerkennung abhängig. Die Art der Immunantwort wird vermutlich durch den Zelltyp der APC und ihren Aktivierungszustand

beeinflusst und hängt davon ab, welche Liganden für akzessorische Moleküle und welche Zytokine sie exprimieren bzw. sezernieren. Die Immunantwort, die ein bestimmtes Antigen induziert, hängt weiterhin von der Art und Weise des Eintritts in den Organismus, der Konzentration, der Dauer und dem Zeitpunkt der Anwesenheit im Organismus und von der Frage ab, ob es in Verbindung mit einer Inflammation angetroffen wurde.

Ein bereits oben erwähntes und gut charakterisiertes costimulatorisches Molekül ist CD28. Die Bindung an seine Liganden B7-1(CD80) und B7-2 (CD86) auf der APC bewirkt gemeinsam mit der T-Zellrezeptor-Bindung eine 30-100mal erhöhte IL-2-Produktion, welche die Proliferation und damit die klonale Expansion der T-Lymphozyten erst ermöglicht (June 1989 [23], Lindstein 1989 [24], Fraser 1991 [25], Linsley 1991 [26], Nunes 1994 [27]).

24 Stunden (h) nach einer antigenen Stimulation exprimieren T-Zellen zusätzlich CTLA-4 (engl. cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4 oder CD152), das ebenso B7-1 und B7-2 bindet, jedoch mit einer deutlich höheren Affinität als CD28. CTLA-4 ist nicht an der Aktivierung naiver T-Zellen beteiligt, sondern vermittelt eher inhibitorische Signale und hat möglicherweise eine negative regulatorische Funktion (Linsley 1992 [28], Walunas 1994 [29]). Zusätzlich sind noch eine Reihe anderer costimulatorischer Moleküle an der T-Zell-Aktivierung beteiligt (van Seventer 1991 [30], Hogg 1993 [31]).

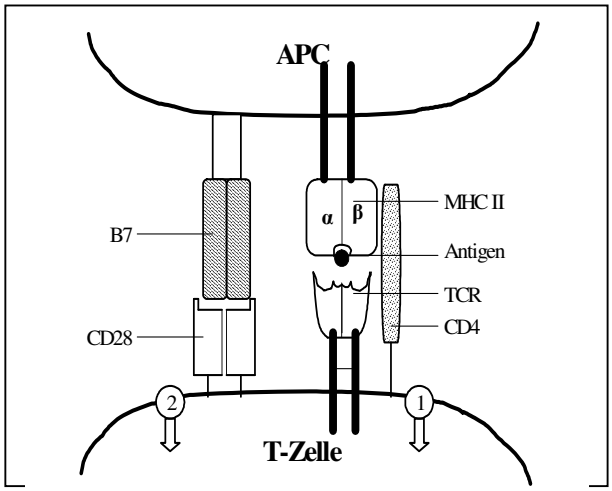

Abbildung 2.2: **T-Zell-Aktivierung**

Signal 1 und 2. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen bei der Aktivierung von $CD4^+$-Klasse-II-restringierten T-Zellen. Eine vollständige Aktivierung der T-Zellen erfolgt nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor (Signal 1) und Interaktion von costimulatorischen Molekülen (Signal 2), z.B. Bindung von B7 auf einer APC an CD28 auf der T-Zelle.

2.5 Immunologische Toleranz

Wie in Abschnitt 2.4. erwähnt, ist in Vertebraten eine Vielzahl von verschiedenen T-Zellrezeptoren vorhanden. Durch Rekombination der codierenden Gene ist es möglich bis zu 10^9 verschiedene T-Zellrezeptoren zu kreieren (Chien 1984 [32]). Zweifellos sind unter diesen in der Entwicklung von T-Zellen generierten Rezeptoren auch Selbstantigen erkennende T-Zellrezeptoren. Diese potentiell autoreaktiven T-Zellen müssen zum Wohle des Organismus zumindest unter Kontrolle gehalten werden, das betreffende Antigen muss immunologisch toleriert werden. Immunologische Toleranz basiert auf mehreren Mechanismen. Im folgenden Abschnitt werden einige verschiedene Mechanismen besprochen.

2.5.1 Zentrale Toleranzinduktion im Thymus

Der Hauptmechanismus der T-Zell-Toleranz ist die Deletion autoreaktiver T-Zellen. Der Ort dieser (klonalen) Deletion ist der Thymus. Unreife T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern in den Thymus ein und werden dort mit Selbstantigenen konfrontiert. Über Wechselwirkungen mit Thymusepithelzellen und nicht-lymphatischen Zellen (hauptsächlich dendritischen Zellen und Makrophagen) findet hier die Selektion geeigneter T-Lymphozyten statt. (Sprent 1988 [33]; Schwartz 1989 [34]). Hier werden endogene Peptide MHC-gebunden präsentiert. Lymphozyten, deren Rezeptoren eine zu hohe Affinität zu den MHC-Molekülen des eigenen Organismus oder zu den präsentierten Eigenpeptiden aufweisen, werden hier deletiert. In den entsprechenden Zellen wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet. Auf diese Weise wird die Anzahl hochaffiner, selbstreaktiver Zellen stark reduziert. Dieser Vorgang wird auch als negative Selektion bezeichnet (Nossal 1994 [35]). Andere T-Zellen zeigen keine Aktivität bezüglich der präsentierten Antigene und MHC Moleküle; sie erhalten offensichtlich keine Überlebenssignale und sterben ebenfalls ab. T-Zellen mit mittlerer Affinität zu Selbstantigenen und MHC erhalten Reifungssignale und reifen im Thymus zu reifen T-Zellen aus (Von Boehmer und Kisielow 1993 [36], Huesmann 1991 [37], Mariathasan 1999 [38]). Sie werden anschließend in die Peripherie entlassen. Dieser Vorgang wird als positive Selektion bezeichnet.

2.5.2 Periphere Toleranzinduktion

Nicht alle autoreaktiven T-Zellen werden im Thymus eliminiert, selbst einige hochaffine autoreaktive Immunzellen entgehen der negativen Selektion. Das kann unter anderem daran liegen, dass das betroffene Selbstantigen im Thymus nicht, oder in nicht quantitativ ausreichender Menge exprimiert wird, oder davon abhängen, in welcher Form (membrangebunden oder löslich) es angeboten wird (Vafiadis 1997 [39], Pugliese 1997 [40], Akkaraju 1997 [41]). Um in

einem solchen Fall den Ausbruch einer Autoimmunerkrankung zu verhindern existieren zusätzliche Sicherungsmechanismen. Sie induzieren und erhalten dann eine T-Zell-Toleranz außerhalb des Thymus, in der Peripherie.

2.5.2.1 Periphere Deletion von T-Zellen/ Klonale Deletion

Das Aufeinandertreffen einer autoreaktiven T-Zelle mit seinem Antigen in der Körperperipherie muss nicht zwangsläufig zur autoimmunen Reaktion führen. Bekommt die T-Zelle in diesem Fall kein costimulatorisches Signal durch die präsentierende Zelle, wird die T-Zelle nicht aktiviert bzw. sogar deletiert. Sollte die T-Zelle doch aktiviert werden, so fehlen ihr in der Regel weitere Wachstumsfaktoren, welche für gewöhnlich aus der Umgebung und von anderen ebenfalls aktivierten Immunzellen stammen. Aufgrund des Wachstumsfaktoren-Mangels sterben diese Zellen wieder ab (Goodnow et al. 1997 [41], Ferber 1994 [42], Kurts 1997 [43]).
Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion ist der aktivierungsinduzierte Zelltod (engl.: activation induced cell death, AICD). Dieser Mechanismus stellt für gewöhnlich sicher, dass T-Zellklone, die im Rahmen einer Immunantwort expandiert sind, anschließend wieder dezimiert werden. Dieses Verhalten beobachtete Webb nach Konfrontation von T-Zellen mit Superantigen (Webb 1990 [44]). Der AICD ist ein Apoptose-Prozess. Durch wiederholte Aktivierung der T-Lymphozyten durch ihr spezifisches Antigen wird eine Fas-abhängige Apoptose induziert. Bei aktivierten $CD4^+$-T-Helferzellen erfolgt eine Coexpression der Oberflächenmoleküle Fas (CD95) und Fas-Ligand (FasL bzw. CD95L). Das Aufeinandertreffen dieser Moleküle erzeugt ein apoptotisches Signal und induziert einen programmierten Zelltod (Nagata 1994 [45], Dhein 1995 [46], Ju 1995 [47]). Autoreaktive T-Zellen, welche wiederholt auf persistierende Antigene (z.B. Selbst-Antigene) treffen, werden dadurch eliminiert. Menschen, welche einen Defekt im CD95 aufweisen, leiden häufig unter lymphoproliferativen Erkrankungen (Rieux-Laucat 1995 [48]; Fisher 1995 [49]; Van Parijs 1998 [50, 51]; Rathmell 1995 [52]). Weiterhin existieren im menschlichen Körper Gewebe, deren Zellen natürlicherweise CD95L exprimieren, wie z.B. die vordere Augenkammer (Griffith 1995 [53]). Folglich müssen T-Zellen, welche in dieses Gewebe eindringen, Apoptose begehen und können das Gewebe nicht durch eine Entzündungsreaktion schädigen. HIV-Viren z.B. umgehen einen Angriff durch T-Zellen u. a. über Induktion des CD95L in den von ihnen infizierten Makrophagen, was dazu führt, dass in den entsprechend spezifischen T-Zellen Apoptose induziert wird. Die Expression von CD95L auf Tumorzellen könnte ein Mechanismus für eine ungebremste Expansion darstellen.

2.5.2.2 Anergie

Eine Antigenerkennung durch Lymphozyten in Abwesenheit eines zweiten costimulatorischen Signals muss nicht zwangsläufig zur Apoptose führen. Einige Zellen geraten in einen Zustand

mit fehlender Reaktivität (engl.: functional unresponsiveness), der auch als Anergie bezeichnet wird. Diese Zellen haben zwar ihr Antigen gesehen, zeigen aber weder Apoptose noch die erwartete klonale Expansion und Zytokinsekretion. T-Zell-Anergie konnte zunächst *in vitro* (Feldmann 1983 [54], Jenkins 1987 [55]), später auch *in vivo* experimentell hergestellt werden (Falb 1996 [3]).

In verschiedenen T-Zellrezeptor-transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die antigenspezifischen T-Zellen durch nichtimmunogene Antigenapplikation (z.B. aggregatfrei in Kochsalzlösung i.v.) zwar noch vorhanden sind, aber letztlich weder expandieren (proliferieren) noch IL-2 im gewohnten Maße sezernieren und aus diesem Grund keine systemische Immunantwort auslösen (Jenkins et al. 1994, 1998 [2, 56]). Die fehlende T-Zell-Antwort ist somit nicht durch eine Deletion der antigenspezifischen T-Zellen bedingt. Durch unspezifische Stimuli können diese zur Proliferation und Zytokinproduktion angeregt werden, was ihre Vitalität anzeigt (Jenkins und Schwartz 1987 [55], Rocha 1993 [57], Falb 1996 [3]). In einigen Systemen wurde gezeigt, dass Anergie durch exogene Zugabe von IL-2 aufgehoben werden konnte (Fortis 1997 [58]). Auf molekularer Ebene scheint Anergie durch eine negative Regulation der IL-2-Gentranskription bedingt zu sein (DeSilva 1996 [59]; Fields und Mariuzza 1996 [15]; Li 1996 [60]).

Einige Studien weisen daraufhin, dass der nichtreaktive Zustand in einigen Modellen der T-Zell-Anergie nicht aufgrund fehlender B7-vermittelter Costimulation induziert wurde, sondern weil diese T-Zellen den CTLA-4-Rezeptor zur Erkennung des B7-Moleküls verwenden (Perez 1997 [61]). Da CTLA-4 mit höherer Affinität an B7-Moleküle bindet als CD28, wurde vermutet, dass eine geringe B7-Expression eher zur CTLA-4-Bindung führt. Andererseits kann die Wahl zwischen CTLA-4 und CD 28 auch durch andere Stimuli, wie inflammatorische Zytokine, reguliert werden, die zum Zeitpunkt der Antigenerkennung präsent sind.

2.5.2.3 Suppression durch regulatorische Zytokine

Das Konzept antigenspezifischer Suppressor-/ Regulatorzellen wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Es ist schwierig, die für die Suppression verantwortlichen Zellen zu isolieren und zu charakterisieren. Es handelt sich dabei wohl um $CD4^+$ und $CD25^+$ Zellen. Diese Zellen scheinen benötigen zur Entfaltung ihrer suppressiven Funktion offensichtlich Antigen- sowie Zell-zu-Zell-Kontakt und IL-2 in ihrer Umgebung. Interessanterweise exprimieren diese Zellen CTLA-4 (s.u.) und sezernieren kein IL-2. Derzeit bestehen mehr Fragen als Antworten bezüglich der Funktion und Funktionsweise dieser Zellen. (Olivares-Villagomez 1998 [62], V.d. Keere 1998 [63], einen derzeit aktuellen Überblick gibt Shevach 2002 [64]).

Weiterhin lässt sich beobachten, dass z.B. bestimmte Zytokine wie TGF-β oder IL-10 diesbezüg-

lich eine regulatorische Potenz besitzen und T-Zellen in ihrer Aktivität zu hemmen vermögen. Dabei hemmt TGF-β1 (engl.: transforming growth factor β1) die Proliferation der Lymphozyten und IL-10 hemmt die Aktivierung von Makrophagen und die Expression von Costimulatoren (Wahl 1994 [65]; Mosmann 1991 [18] und 1993, Buer 1998 [66]). Diese inhibitorischen Zytokine schränken die klonale Expansion spezifischer Lymphozyten ein und lassen aktivierte Makrophagen und andere inflammatorische Zellen in ihren Ruhezustand zurückkehren.

2.5.2.4 Immunologische Ignoranz

Die Immunisierung von Tieren mit Selbstantigenen in Adjuvans kann Autoimmunität induzieren und setzt voraus, dass diese Tiere potentiell autoreaktive Zellen besitzen. Auch in Menschen sind autoreaktive T- und B-Zellen zu finden (Kitze 1988 [10], Naquet 1988 [9]). Autoreaktive T-Zellen sind also in der Peripherie vorhanden, ignorieren ihr spezifisches Antigen jedoch, so dass funktionell die T-Zell-Toleranz erhalten bleibt. Diesbezüglich wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, von denen folgendes erwähnt werden soll: T-Zellrezeptor-transgene Mäuse, deren T-Zellen zu 60 bis 85% einen für ein Antigen des Choriomeningitis-Virus (LCMV) spezifischen T-Zellrezeptor tragen, wurden mit Mäusen gekreuzt, die das LCMV-Antigen (Protein) unter Kontrolle des Insulin-Promoters auf den pankreatischen Inselzellen exprimierten. Die Nachkommen dieser Kreuzung entwickelten keinen Diabetes. Da die T-Zellen dieser Mäuse aber in der Lage waren, *in vitro* auf das Antigen zu reagieren und die präsentierenden Zellen zu töten (Ohashi 1991 [67], Lewicki 1991 [68]), spricht man hier von immunologischer Ignoranz. Für diese Art von Toleranz werden folgende Mechanismen postuliert. Das betreffende Antigen wird unterhalb einer bestimmten Schwellendosis exprimiert, was zur Folge hat, dass die spezifischen T-Zellen weder aktiviert noch deletiert werden (s.o.) (Akkaraju 1997 [41], Ferber 1994 [42]). Spezifische Zellen werden durch eine physiologisch / physikalische Barriere von ihrem Antigen getrennt (auch als Sequestration bezeichnet, z.B. durch die Blut-Hirn-Schranke). Auch das Fehlen einer Costimulation könnte die Zellen dazu veranlassen, das gesehene Antigen zu ignorieren (Janeway 1992 [69]). Dieser Toleranzmechanismus könnte dazu führen, dass z.B. das Papilomavirus mit der Vorliebe für peripheres Gewebe und einer nur schwachen Antigenexpression sich oft ungehindert vermehrt.

In der folgenden Abbildung wurden die wichtigsten postulierten Mechanismen zur Induktion peripherer T-Zell-Toleranz schematisch dargestellt und zusammengefasst:

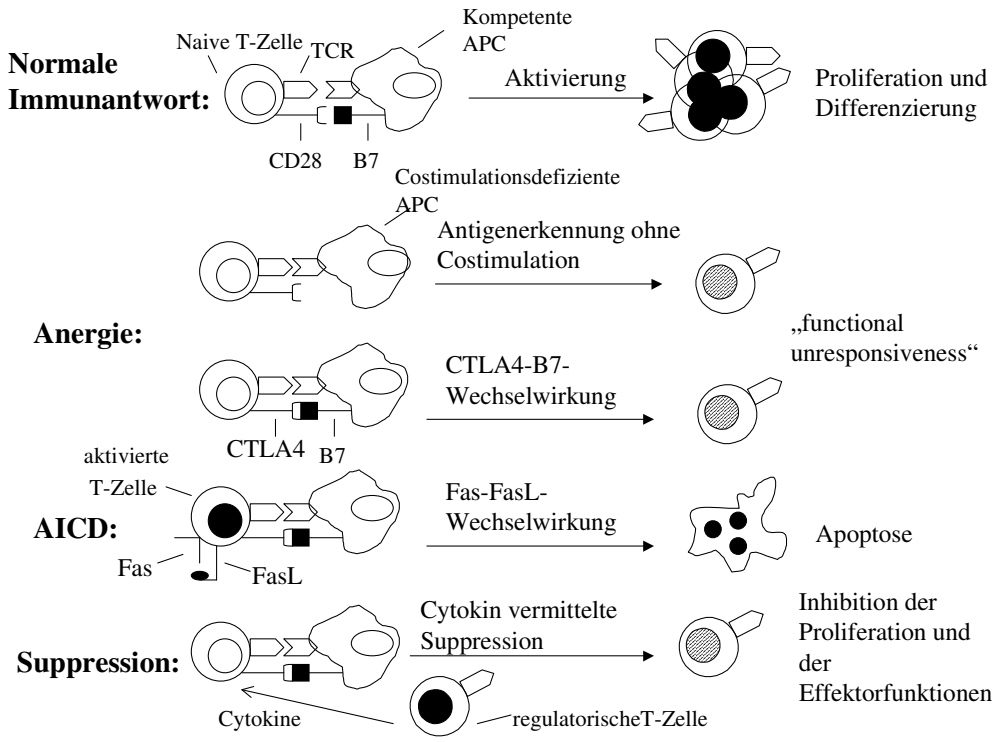

Abbildung 2.3**: Postulierte Mechanismen für periphere T-Zell-Toleranz;**
Nach Luk Van Parijs [50]. Eine normale T-Zellantwort wurde durch Antigenerkennung über den T-Zellrezeptor und costimulatorische CD28/B7-Wechselwirkung ausgelöst und führt zur klonalen Expansion, Differenzierung und Zytokinsekretion der aktivierten T-Zelle. Anergie kann durch Antigenerkennung ohne Costimulation oder durch CTLA-4/B7-Wechselwirkung induziert werden und führt zur funktionalen Nichtreaktivität der betreffenden T-Zelle. AICD führt zum apoptotischen Tod aktivierter T-Zellen. „Regulatorische“ T-Zellen können durch Sekretion immunosuppressiver Zytokine die Proliferation und die Effektorfunktionen von T-Zellen inhibieren.

2.6 Verlust von T-Zell-Toleranz und Entwicklung von Autoimmunität

Ungeachtet all dieser genannten Toleranzmechanismen entstehen autoimmune Erkrankungen. Prinzipiell muss gesagt werden, dass allein die zentrale Toleranzinduktion im Thymus erhebliche Schwankungen in der Effektivität der negativen Selektion zeigt (Klein 2000 [70]). Wie oben bereits erwähnt, werden einige endogene Antigene wie z.B. das Insulin manchmal nur sehr schwach im Thymus präsentiert, womit die Wahrscheinlichkeit steigt, dass potentiell autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion entgehen. Diese Variabilität in der Expression bzw. Präsentation von endogenen Antigenen kann z.B. erblich bedingt sein (Vafiadis 1997 [39], Pugliese 1997 [40]).

Weiterhin existieren T-Zellen mit zwei verschiedenen T-Zellrezeptoren. Es konnte nachgewiesen werden, dass bis zu 30% aller im peripheren Blut des Menschen gefundenen T-Zellen zwei unterschiedliche Rezeptoren tragen (Padovan 1993 [71]). Während der T-Zell-Reifung im

Thymus wird zunächst das Gen für die β-Kette des T-Zellrezeptor rearrangiert. Dies geschieht nur auf einem der beiden Chromosomen und wird unterbrochen, sobald die erste ß-Kette produziert wurde. Die Gene für die α-Kette indes werden simultan auf beiden Chromosomen rearrangiert. Dabei ist es möglich, dass zwei verschiedene α-Ketten produziert und mit der β-Kette kombiniert werden. Es entstehen zwei verschiedene T-Zellrezeptoren mit derselben β-Kette (Malissen 1988 [72]). Einer der so entstandenen T-Zellrezeptoren könnte potentiell „autoreaktiv" sein und der andere gleichzeitig im Thymus positiv selektioniert werden (Liu 1995 [73], von Boehmer et al. 1998 [74]). Eine solche T-Zelle könnte durch ein organismusfremdes Antigen aktiviert werden und in diesem Zustand auch das Selbstantigen „attackieren". Überhaupt ist der Mechanismus der Infektion und anschließender Ausbruch von Autoimmunität ein interessanter Prozess, welcher zu intensiven Nachforschungen veranlasste. Z.B. geht im Rahmen einer Infektion Gewebe zugrunde, welches dann bisher sequestrierte Antigene freisetzen kann (Miller 1997 [75]). Es ist erstaunlich, wie selten demzufolge eine Autoimmunerkrankung entsteht.

Durch sog. Superantigene, welche gleichzeitig eine große Menge an T-Zellen (polyklonal) aktivieren, könnten auch autoreaktive T-Zellen aktiviert werden (Perron 1997 [76]).

Die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und costimulatorischen Molekülen durch mikrobielle Substanzen wie Toxine (Kamradt 1991 [77]) und Lipopolysaccharide (Tough 1997 [78]) könnten ein entsprechendes Milieu schaffen.

Eine weitere Hypothese ist die „molecular mimikry"-Hyphothese. Aufgrund struktureller Verwandtschaft eines mikrobiellen Antigens mit einem Selbstantigen kann eine so genannte Kreuzreaktivität resultieren (Jahnke 1985 [79], Fujinami 1985 [80]). Die pathogenetische Bedeutung dieser Begebenheit ist unklar, prinzipiell ist sie aber (unter anderen) als eine Genese autoimmuner Reaktionen denkbar. Nachforschungen haben ergeben, dass ein T-Zellrezeptor häufig mehrere, teilweise in ihrer Struktur beträchtlich differierende Peptide erkennen kann (Grogan 1999 [81], Reay 1994 [82]), was die These einer Kreuzreaktivität unterstützt.

Letztendlich findet nach wie vor eine intensive Suche nach den genetischen Ursachen für Autoimmunerkrankungen statt. Die in erkrankten Tieren gefundenen genetischen Veränderungen finden sich z.B. an Genen, welche für Zytokine und deren Rezeptoren codieren (Scott 1994 [83]). Die Studien am menschlichen Genom erkrankter Patienten konnten bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Beobachten ließ sich allerdings das Zusammentreffen spezieller HLA Typen mit bestimmten Erkrankungen (gut erforscht bezüglich des Diabetes mellitus Becker 1998 [84], Concannon 1998 [85], Mein 1998 [86]).

2.7 (Wieder-) Herstellung von T-Zell-Toleranz

Die (Wieder-) Herstellung von T-Zell-Toleranz als therapeutische Intervention wird derzeit intensiv untersucht. Es könnte hiermit möglich werden, bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Allergien therapeutisch zu intervenieren und in der Transplantationsmedizin Abstoßungsreaktionen schonend, evtl. präventiv zu behandeln. Eine solche Therapie sollte die Möglichkeit bieten, einerseits präventiv Autoimmunität zu verhindern, aber auch verloren gegangene Toleranz wieder herzustellen. In der Praxis lassen sich die in Tiermodellen bereits durchgeführten Versuche nicht immer auf den Menschen übertragen. Beispielhaft lässt sich an Hämophilie A erkrankten Menschen, welche im Rahmen einer Faktor VIII Substitutionsbehandlung Antikörper gegen Faktor VIII entwickeln, eine Toleranz gegenüber Faktor VIII induzieren. Durch Langzeit-Infusionen größerer Mengen Faktor VIII konnte die ungewünschte Immunreaktion in über 80% der Patienten zum Erliegen gebracht werden (Brackmann 1977 [87], Mariani 1994 [88]).
Im Folgenden werden einige der Interventionen besprochen.

2.7.1 Induktion immunologischer Toleranz durch Applikation von Antigen

Eine Induktion immunologischer Toleranz kann sowohl durch orale als auch durch parenteral/systemische Gabe von Antigen erzielt werden.
Bereits 1911 bemerkte Wells, dass eine anaphylaktische Reaktion von Meerschweinen durch vorhergehende Fütterung des auslösenden Agens verhindert werden konnte. Für die parenterale Gabe von Antigen ist bekannt, dass sie zu antigenspezifischer Hyporeaktivität betroffener T-Zellen führt (Weigle et al. 1970 [89]). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Applikation des für die Erkrankung spezifischen Antigens den Ausbruch von Autoimmunität verhindern konnte (Levine 1972 [90]). Insgesamt überwiegen die Erfolge in der primär präventiven Applikation von Antigen. Bei bereits manifester Erkrankung zeigt diese Art von Therapie nur begrenzte Wirkung (Keller 1993 [91], Warren 1997 [4], Norman 1997 [92], Bousquet 1998 [93], Übersicht in Kamradt 2001 [6]).
Eine weitere Möglichkeit ist, den T-Zellrezeptor der pathologisch reagierenden T-Zellen durch antagonistisch wirkende (Peptid-) Antigene zu blockieren, ohne eine intrinsische Aktivität zu induzieren. Diese Intervention stützt sich auf die Beobachtung, dass einige Viren der immunologischen Abwehr entgehen, indem sie die Produktion antagonistisch wirkender Peptide induzieren (Bertoletti 1994 [94]).
Es muss gesagt werden, dass bei all diesen Interventionen die Gefahr einer Aktivierung von Autoimmunität durch Gabe des betreffenden Antigens besteht, und es so zur Verschlechterung der gesundheitlichen Situation kommen kann.

2.8 Modelle zur Untersuchung peripherer T-Zell-Toleranz

Die Induktion von peripherer T-Zell-Toleranz kann durch periphere Deletion, Suppression oder Anergie erzeugt sein und wurde in zahlreichen unterschiedlichen T-Zellrezeptor-transgenen Maussystemen beschrieben. Versuche mit normalen Mäusen, denen Superantigen injiziert wurde, sprechen für eine periphere Deletion im Rahmen eines antigeninduzierten Zelltodes der entsprechenden T-Zellen (Webb 1990 [44]; Kawabe und Ochi 1991 [95]).

Für Anergie existieren viele verschiedene Modelle (Übersicht in Schwartz 1996 [96]), und bisher ist es noch nicht gelungen, einen gemeinsamen Induktionsweg oder alle zugrunde liegenden molekulare Mechanismen zu identifizieren. *In vitro*-Modelle zeigen, dass chemisch fixierte APC´s, welche Antigene präsentieren, nicht in der Lage sind, Th1-Klone zu aktivieren (Jenkins et al. 1987 [55], [97]). Möglicherweise liegt die Unfähigkeit der mit Peptid fixierten APC´s, costimulatorische Signale auszulösen daran, dass APC´s solche Signale nur im Kontext mit Antigen vermitteln können, das eine endocytotische Prozessierung durchlaufen hat. Auch andere *in vitro*-Modelle belegen, dass eine Aktivierung des T-Zellrezeptor in Abwesenheit anderer costimulatorischer Signale den nichtreaktiven Zustand dieser Zellen bewirkt. So genügen planare Membranen, die lediglich Lipide, MHC-I-E^k-Moleküle und Peptide aus dem Cytochrom-C-Protein der Taube (engl.: pigeon cytochrome c, pcc) enthalten, um bei spezifischen murinen Th-Klonen Anergie zu induzieren (Quill und Jenkins 1987 [97]). Experimentell kann *in vitro* mit anti-CD3-Antikörpern ebenfalls Anergie in Th1-Klonen induziert werden (Jenkins 1990 [98].

Eine funktionelle Nichtreaktivität von T-Zellen konnte auch in verschiedenen *in vivo*-Modellen gezeigt werden. In einem sogenannten murinen adoptiven Transfersystem wurden für das Ovalbumin-Protein spezifische $CD4^+$-T-Zellrezeptor-transgene T-Zellen in syngene, normale Rezipienten übertragen. Die Peptid und MHC-spezifische T-Zellpopulation wird damit in den Empfängermäusen angereichert und ist dann groß genug, um sie durch durchflußcytometrische Methoden verfolgen zu können.

Voraussetzung hierfür ist z.B. der auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzte, klonotypische Antikörper (mAk) KJ 1.26, welcher spezifisch den T-Zellrezeptor der OVA-transgenen T-Zellen (DO11.10-T-Zellen) erkennt (Haskins 1983 [99]). Die T-Zellen dieser transgenen Mäuse exprimieren überwiegend den α/β-T-Zellrezeptor der T-Zell-Hybridomlinie DO11.10, welcher für das Peptidfragment aus den Aminosäureresten 323-339 des Ovalbumin-Proteines (OVA) im Kontext mit dem MHC-Klasse-II-Molekül I-A^d spezifisch ist (Shimonkevitz 1984 [100], Murphy 1990 [101])

Die Anreicherung dieser Zellen in der normalen Empfänger-Maus im Rahmen von Transferexpe-

rimenten könnte einer klonalen Expansion nach Antigenkontakt entsprechen mit der Ausnahme, dass die transferierten Zellen naiv, also noch ohne Antigenkontakt sind. Gleichzeitig scheint die Anzahl klein genug, um sich in physiologischer Weise zu verhalten, wenn sie ihrem Antigen *in vivo* begegnen (Kearney 1994 [2], Pape 1997 [102]). In diesem System konnte gezeigt werden, dass lösliches Antigen eine transiente Akkumulation und den nachfolgenden Verlust der transferierten transgenen T-Zellen bewirkt. Die überlebenden Zellen wiesen jedoch anscheinend eine funktionale Hyporeaktivität auf. Im Unterschied dazu bewirkt gemeinsam mit einem Adjuvans, wie z.B. komplettes Freund's Adjuvans (CFA, engl., Mineralöl, das hitzegetötete Mycobacterii tuberculosis enthält), subkutan verabreichtes Antigen eine Hyperreaktivität der betreffenden Zellen. Man weiß, dass aggregierte, phagocytierte oder gemeinsam mit Adjuvans verabreichte Peptid-Antigene eine Immunisierung auslösen, während lösliche, nicht aggregierte, intravenös applizierte Peptid-Antigene tolerogen wirken (Liblau 1994 [103]). Intravenös applizierte Antigene werden möglicherweise von Zellen präsentiert, die nicht in der Lage sind, zusätzliche costimulatorische Signale zu vermitteln, während Makrophagen und andere Zellen, die solche Signale bereitstellen können, unlösliche Antigenformen über Prozessierung präsentieren.
In einem anderen Modell sind thymektomierte Mäuse, welche einen transgen T-Zellrezeptor für ein Peptid des Cytochrom-C-Proteins der Motte sind, auf die Induktion einer antigenspezifischen Hyposensitivität untersucht worden. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine *de novo*-Differenzierung von T-Zellen im Thymus nach intravenöser Antigen-Injektion stattfindet. Die beobachteten Zellen sind demzufolge alle manipulierte T-Zellen. Eine Beeinflussung durch nachgereifte, antigenspezifische T-Zellen kann so ausgeschlossen werden. Da der prozentuale Anteil transgener T-Zellen 14 und 35 Tage nach i.v.-Injektion sowohl bei den mit Peptid als auch bei den nur mit Kochsalzlösung behandelten Mäusen ähnlich war, schlossen die Experimentatoren eine periphere Deletion der betreffenden Zellen aus und nahmen Anergie als Ursache für die Hyposensitivität an (Falb 1996 [3]).
Als alternative Erklärung für die auftretende funktionale Nichtreaktivität von $CD4^+$-T-Zellen *in vivo* wird auch eine Modulation der Immunantwort diskutiert. So zeigten einige Studien, dass eine aufgrund des Verlustes der Th1-Zytokinproduktion vermutete Anergie tatsächlich ein ungewöhnliches Verhalten der autoreaktiven T-Zellen ist, die auf eine antigene Stimulierung mit der Produktion einer begrenzten Anzahl von Th2-Zytokinen antworten, und deshalb nicht in der Lage sind, Zellwachstum zu bewirken (Burstein 1992 [104], Rocken und Shevach 1996 [105]). In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass bei naiven T-Zellen, die über ihren T-Zellrezeptor in Abwesenheit costimulatorischer Signale stimuliert wurden, Anergie induziert werden kann (Davis und Lipsky, 1993 [106], Sagerstrom 1993 [107]). Aufgrund dieser Befunde

wurde diskutiert, dass es sich bei der funktionellen Inaktivierung nicht um einen peripheren Toleranzmechanismus, sondern um einen transienten Zustand handelt, den tolerisierte Zellen durchlaufen, bevor sie deletiert werden (Matzinger 1994 [108]). Es konnte allerdings in einem „adoptive-transfer-System“ mit $CD4^+$ Ovalbumin-spezifischen T-Zellrezeptor transgenen T-Zellen gezeigt werden, dass eine Population anerger, antigenspezifischer T-Zellen bis zu 49 Tage nach Toleranzinduktion (Tolerisierung) durch i.v. Injektion des löslichen Antigens *in vivo* nachweisbar ist (Pape 1998 [56]).

2.9 Induktion peripherer Toleranz durch alterierte Peptidantigene

Es lässt sich beobachten, dass ein T-Zellrezeptor mehrere in ihrer Aminosäuren-Sequenz (AS-Sequenz) unterschiedliche Peptidantigene zu erkennen vermag (Kersh 1996 [109]). Nicht alle erkannten Antigene führen hierbei zu einer vollen Aktivierung der T-Zelle, vielmehr lässt sich eine Fülle von Reaktionsmustern beobachten. Prinzipiell können Antagonisten (Sette et al. 1992 [110], Evavold 1993 [111], Bertoletti 1994 [94]) am T-Zellrezeptor von Agonisten unterschieden werden. Es ist aber auch ein partieller Agonismus beobachtet worden. Die betroffenen Zellen zeigten hier zwar keine Proliferation, antworteten aber mit verstärkter IL-4 Sekretion (Evavold 1991 [112]).

Agonisten lassen sich in starke und schwache Agonisten entsprechend der induzierten Proliferation und Zytokinsekretion unterscheiden. Vermutlich liegt der unterschiedlich starken Reaktion eine unterschiedlich hohe Affinität und Dissoziation zum bzw. vom T-Zellrezeptor zu Grunde, ebenso ist die Dissoziation des Peptid/MHC-Komplex bedeutend (Lyons 1996 [113]).

Der Einsatz von Peptiden in Diagnostik und Therapie hat in der heutigen Medizin weite Verbreitung gefunden. Die Synthese von Peptiden und Peptidanaloga ist kostenintensiv. In der Regel basieren diese Peptide auf linksdrehenden (L-) Aminosäuren (L-Peptide). Diese Peptide haben den Nachteil, dass sie durch unspezifische Proteasen, welche in Geweben und Gewebeflüssigkeiten anzutreffen sind, schnell abgebaut (gespalten) werden. L-Peptide eignen sich unter anderem deshalb nur bedingt für den therapeutischen Einsatz.

Peptide, welche rechtsdrehende AS beinhalten, bzw. total invertierte L-Peptide (Retro-inverso (D-) Peptide), zeigen gegenüber proteolytischen Abbau eine erhöhte Resistenz (Fauchere und Thurieau 1992). Aufgrund des gewöhnlich schnellen Abbaus von L- Peptiden *in vivo* stellen die D-Peptide eine interessante Alternative in der Therapie autoimmuner Erkrankungen und zur Vakzination dar (Van Regenmortel 1998 [8, 114]).

2.10 Zielsetzung

Aufgrund der Stabilität von D-Aminosäuren-substituierten Peptiden (D-Peptide) sollte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, ob D-Peptide in der Lage sind, antigenspezifische Toleranz *in vivo* (in einem Mausmodell) in T-Zellen zu induzieren. Wegen der besonderen Stabilität dieser Peptide sollte weiterhin überprüft werden, ob die Toleranzinduktion durch D-Peptide Vorteile gegenüber der durch L-Peptiden induzierten Toleranz zeigt. Zusätzlich sollte die Art der induzierten Toleranz beobachtet werden, weswegen wir auch Versuche in einem adoptiven Transfersystem Kearney (1994 [2]) durchführten. Die Peptide wurden in verschiedenen Konzentrationen appliziert und die induzierte Toleranz über maximal 60 Tage beobachtet und untereinander verglichen werden, um etwaige Vor- bzw. Nachteile von D-AS-substituierten Peptiden festzustellen.

3 Material

3.1 Mäuse

BALB/c-Mäuse:	H-2^d Haplotyp. Inzuchtstamm, ursprünglich Bar Harbor Main
DO11.10-Mäuse:	H-2^d Haplotyp. Transgener Mäusestamm. Transgen für α/β-T-Zellrezeptor. Die T-Zellen dieser Mäuse exprimieren den α/β-T-Zellrezeptor der T-Zell-Hybridomlinie DO11.10, dieser ist für die Aminosäure-sequenz (323-339) des Ovalbumin-Proteines spezifisch. Das Peptid wird gebunden am MHC-Klasse II-Molekül-I-A^d erkannt. Die Mäuse werden auf dem BALB/c-Hintergrund gehalten. BALB/c X DO11.10- Mäuse: Rückkreuzung, MPI für Infektionsbiologie,BgVV.

Alle verwendeten Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in den Räumlichkeiten des BgVV Berlin Marienfelde gehalten.

3.2 Reagentien und Chemikalien

• Ammoniumchlorid:	Merck, D-64271 Darmstadt
• BSA (engl.,Bovin Serum Albumin):	ICN, D-37269 Eschwege
•Complete Freunds Adjuvants (engl., CFA)	Sigma, St. Louis, Missouri USA
• Dinatriumcarbonat:	Merck, D-64271 Darmstadt
• Dimethylsulfoxid:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Ethanol absolut:	Merck, D-64271 Darmstadt
• ExtrAvidin-Peroxidase:	Sigma, D-89552 Steinheim
• FCS:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Ficoll Paque:	Pharmacia Biotech, D-79111 Freiburg
• L-Glutamin:	Seromed, D-12247 Berlin
• Ionomycin:	Sigma, D-89552 Steinheim
• 2-Mercaptoethanol:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Natriumacetat:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Natriumazid:	Sigma, D-89552 Steinheim

• Natriumchlorid:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Natriumhydrogencarbonat:	Sigma, D-89552 Steinheim
• NMS (Normal-Mausserum):	BALB/c DRFZ
• Paraformaldehyd:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Phosphate buffered saline (PBS):	Sigma, D-89552 Steinheim
• Penicillin-Streptomycin:	Seromed, D-12247 Berlin
• PMA:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Propidiumiodid (PI):	Sigma, D-89552 Steinheim
• Schwefelsäure:	Merck-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn
• [Methyl-^{3H}]-Thymidin:	Amersham, D-79111 Freiburg
• Microscint:	Packard, D-63303 Dreieich
• Tris:	ICN, D-37269 Eschwege
• TrypanBlue Solution (0,4%):	Sigma, D-89552 Steinheim
• 2,2,2-Tribromethanol:	Fluka, D-89231 Neu-Ulm
• TMB-Tabletten:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Tris-HCl:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Tween-20:	Merck-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn
• Wasserstoffperoxid:	Sigma, D-89552 Steinheim
• Zitronensäure:	Sigma, D-89552 Steinheim

3.3 Puffer und Zellkulturmedien

3.3.1 Puffer

• **PBS:**	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,3 mM $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$
	1,4 mM KH_2PO_4
• **Lysis-Puffer:**	0.83% NH_4Cl (w/v), 10 mM Tris, (pH=8,0) in PBS
• **Saponin-Puffer:**	0,5% Saponin (w/v), 0,5% BSA (w/v) in PBS
• **FACS-Puffer:**	PBS/0,5% BSA(w/v)/0.01% NaN_3 (w/v)
• **TMB-Puffer:**	0,05 M $Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$
	243 mM Zitronensäure
• **Block-Puffer(IL-2):**	Dulbecco's PBS/0,5% BSA
• **Inkubations-Puffer (PBT):**	PBS/0,5% BSA/0,05% Tween-20

- **Wasch-Puffer:** PBS/ 0,05% Tween-20
- **ELISA-Stop-Lösung:** 12,5% H_2SO_4
- **Zell-Fixierungspuffer:** PBS / 2% PFA (w/v)

3.3.2 Medien

Basierend auf RPMI 1640 der Firma Seromed, D-12247 Berlin.

- **Kulturmedium (KM):** RPMI-1640, 10% FCS, 10 mM L-Glutamin, 20 µM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
- **Wasch-Medium:** RPMI-1640, 1% FCS

3.4 Zytokine, Antikörper und synthetische Peptide

3.4.1 Antikörper und Zytokine

3.4.1.1 Antikörper und Zytokine für ELISA

- Anti-murines-IL-2 : Klon JES6.1A12; rat IgG2a, DRFZ
- Anti-murines-IL-2-biot. : Klon JES6.5H4, biotinyliert DRFZ
- Anti-murines-IL-4 : Klon 11B11 Ratten-IgG, DRFZ
- Anti-murines-IL-4-biot. : Klon BVD 624-6, biotinyliert, DRFZ
- Anti-murines-INFγ :Genzym INFγ ELISA KIT 80-3955-02
- Anti-murines-INFγ-biot. :Genzym INFγ ELISA KIT 80-3955-02, biotinyliert
- Anti-murines-IL-10 :Klon SXC2, DRFZ
- Anti-murines-IL-10-biot. :Klon SXC1, biotinyliert, DRFZ
- murines IL-2 : rekombinantes murines IL-2, DRFZ
- murines IL-4 :rekombinantes murines IL-4, R&D Systems
- murines INFγ :Genzym INFγ ELISA KIT 80-3955-02
- murines IL-10 :rekombinantes murines IL-10, DRFZ

3.4.1.2 Antikörper für FACS-Analyse

• Anti-Maus-OVA-T-Zellrezeptor KJ1-26.1-FITC, KJ1-26.1-PE, KJ1-26.1-Biotin:	Klon KJ1-26.1; spezifisch gegen DO11.10α/β-T-Zellrezeptor; B-Zellhybridom, DRFZ, biotinyliert bzw. konjugiert.

• Anti-Maus-CD4-PE, Anti-Maus-CD4-FITC: Klon GK1.5; (DRFZ) konjugiert.

• SA-PerCP von Becton-Dickinson, Heidelberg; Streptavidin zur Bindung an Biotin als Sekundärfarbstoff für Biotin gekoppelte Antikörper eingesetzt.

3.4.2 Synthetische Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden hergestellt durch Dr. Achim Kramer, Institut für Medizinische Immunologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität, D-10117 Berlin.

Als Ausgangspeptid und Positivkontrolle wurde das Peptidepitop (323-339) des Ovalbumin-Proteins aus Hühnereiweiss (kurz: $OVA_{323-339}$) verwendet. Um die Spezifität der beobachteten Reaktionen zu überprüfen, wurde in den *in vitro* Experimenten Motten-Cytochrom-C (MCC) (88-103) als alternativer Antigenstimulus angeboten. Für die i.v. Injektionen wurden die Peptide in PBS (in der Regel 1mg Peptid/ml PBS) gelöst. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

In der Tabelle unten sind die in den Experimenten verwendeten Peptide im IUPAC-Einbuchstaben-Code (IUPAC= engl. International Union of Pure and Applied Chemistry) dargestellt siehe auch Tabelle 10.1.

Tabelle 3.1: **Verwendete Peptide**:
In dieser Tabelle sind die in den Experimenten verwendeten Peptide im IUPAC-Einbuchstaben Code dargestellt. Die Bezeichnung wurde willkürlich gewählt. Zur Orientierung wird die Position in der Sequenz des Gesamtproteins (Ovalbumin) dargestellt. Großbuchstaben = linksdrehende AS, Kleinbuchstaben und Fett = rechtsdrehende AS).

Bezeichnung	Position	Aminosäuresequenz																
$OVA_{323-339}$	323-339	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R
$OVA_{327-337}$	327-337					V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A		
$OVA_{328-336}$	328-336						H	A	A	H	A	E	I	N	E			
$OVA_{(327-337)327y}$	327-337					**y**	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A		
$OVA_{(327-337)327y337y}$	327-337					**y**	H	A	A	H	A	E	I	N	E	**y**		
$OVA_{(327-337)327y,336q}$	327-337					**y**	H	A	A	H	A	E	I	N	**q**	A		
$OVA_{(327-338)327y,338a}$	327-338					**y**	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	**a**	
MCC	88-103	K	N	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	Q	A	T	K	

Für das zunächst erfolgende Screening (Schnelltest) in der Verkürzungsanalyse (engl. Truncationanalysis) und bei der Substitutionsanalyse wurden die Peptide auf einer Zellulosematrix synthetisiert (siehe auch Grogan und Kramer 1999 [81]). Nach der Synthese wurden die Peptide

von der Zellulose durch Behandlung mit gasförmigen NH_3 abgespalten und die Spots ausgestanzt. Die ausgestanzten Spots wurden anschließend in sterilem Aqua bidest (1ml/Peptid/Spot) gelöst und archiviert. Die Peptid-Spots wurden bei -20°C verwahrt.
Für die Titrationsversuche sowie für die *in vivo* Versuche wurden die ausgewählten Peptide konventionell synthetisiert, aufgereinigt und mittels HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert.

3.5 Geräte

ELISA-Reader:	MR5000 Microplate reader von Dynatech, Denkendorf
Durchflußcytometer:	FACScan von Becton Dickinson, Heidelberg
β-Szintillationszähler:	Microplate Scintillation Counter von Packard, Dreieich

4 Methoden

4.1 Tierversuche

4.1.1 i.v. Peptidinjektion

Je nach Experiment wurden 100µg bis 300µg Peptid in 300µl PBS gelöst und injiziert. Vor der Injektion wurden die Probenlösungen 15 min bei 2000facher Erdbeschleunigung (g) zentrifugiert, um Aggregate zu sedimentieren. Die i.v. Injektionen erfolgten in die laterale Schwanzvene. Die Negativkontrollen (Kontrollmäuse) erhielten PBS ohne Peptid injiziert.

4.1.2 s.c. Peptideinjektionen (Immunisierung)

Zu gegebenen Zeitpunkten (Tag 11, bzw. 33-34 oder 53-54 nach i.v. Injektion des Peptides) wurden die Mäuse durch eine subkutane Injektion von $OVA_{323-339}$ (100µg) in complete Freund´s adjuvans (CFA) pro Maus *in vivo* immunisiert. Es wurde Peptid in PBS (Konzentration 1mg/ml) in gleichem Volumen CFA gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit Hilfe eines Ultraschallrührstab zu einer Emulsion vermischt. Jeder Maus wurden 2x100µl Emulsion s.c. in das Hinterteil, rechts und links neben die Schwanzwurzel injiziert.

4.1.3 i.v. Adoptiv Transfer von DO11.10-Mausmilzzellen

Milzzellen (Präparation s.u.) aus DO11.10-Mäusen bzw. BALB/c x DO11.10- Mäusen wurden in Suspension gebracht, 3x in PBS gewaschen und 3x mit Cell-Strainern gesiebt. Jeder Maus wurden 3 x 10^7 Zellen in 300µl PBS i.v. in die laterale Schwanzvene injiziert. Bis zur weiteren Verwendung der transferierten Mäuse wurde eine Pause von 3 Tagen eingehalten. Hiermit sollte gewährleistet werden, dass die transferierten Zellen in der Empfängermaus normal verteilt sind.

4.1.4 Tötung von Versuchtieren

Die verwendeten Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet.

4.1.5 Entnahme von Geweben aus Versuchtieren

In der Regel wurden die Mäuse 6-8 Tage nach erfolgter s.c. Immunisierung getötet. Nachdem die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet waren, wurde das Fell mit 70% Alkohol desinfiziert. Die Haut über dem Bauch wurde mittels einer sterilen Schere mit einem ca. 5cm langen longitudinalen Hautschnitt eröffnet. Die Maus wurde nochmals mit 70% Alkohol desinfiziert. Durch einen weiteren Schnitt am linken Rippenbogen konnte die Milz dargestellt und gegebenenfalls entfernt werden. Zur Evaluation der Toleranz nach s.c. Immunisierung wurden folgende Lymph-

knoten entnommen: Die paarig angelegten inguinal-superfizialen und poplitealen Lymphknoten, weiterhin die 2-3 unpaarig angelegten periaortalen (iliakalen) Lymphknoten. Für eine Bestandsaufnahme z.B. für eine Kinetik nach adoptivem Transfer wurden zusätzlich zu den oben genannten Lymphknoten noch die axillären und brachialen Lymphknoten entnommen. Die Gewebe wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette entnommen und zügig in Kulturmedium (KM) überführt und wie in Punkt 4.2.1 geschildert weiterverarbeitet.

4.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten an Zellen und Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen der Kulturen mit Pilzen, Bakterien, Viren, Mycoplasmen, etc. zu vermeiden. Die eingesetzte Zelllinie CTLL-2 wurde vor Einsatz in den Experimenten auf Durchseuchung mit Mycoplasmen überprüft. Die eingesetzte Zelllinie erwies sich als mycoplasmenfrei. Beim Umgang mit Tieren, Zellen, Gefahrenstoffen, Radioaktivität und Geräten wurde nach den derzeitigen arbeitsschutzrechtlichen Vorschriften gehandelt.

4.2.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Lymphorganen

Die entnommene Milz bzw. entnommenen Lymphknoten wurden samt Medium in einen Zellsieb (engl. Cell-Strainer) gegossen und homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 200×*g* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurden die sedimentierten Zellen in 10 ml Lysis-Puffer resuspendiert und 10 Minuten (min) bei 4°C (auf Eis) inkubiert, die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden noch zweimal mit Wasch-Medium gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert. Vor dem letzten Waschschritt wurde Zelldebris mittels eines Cell-Strainer entfernt. Die Zellzahl wurde bestimmt (s. 4.2.2.1). Im Anschluss wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration gebracht.

4.2.2 Kultivierung von Lymphozyten aus Lymphorganen

4.2.2.1 Zählen von Zellen

Für die Auszählung wurden die Zellen mit Trypanblau eins zu eins gemischt. Tote Zellen wurden durch Aufnahme von Trypanblau identifiziert und bei der Zählung nicht berücksichtigt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4.2.2.2 Eingesetzte Zellkonzentrationen

Milzzellsuspensionen wurden, wenn nicht anders erklärt, auf eine Konzentration von ($2x10^6$ Zellen/ml) gebracht und in Tripletts (3 benachbart liegende Vertiefungen einer 96-Vertiefungen-

Zellkulturplatte) mit einer Endkonzentration von $2x10^5$ Zellen/200µl/Vertiefung überführt. Lymphknotenzellsuspensionen wurden, wenn nicht anders erklärt, auf eine Konzentration von ($3x10^6$ Zellen/ml) gebracht und in Tripletts einer 96-Vertiefungen-Zellkulturplatte mit einer Endkonzentration von $3x10^5$ Zellen/200µl/ Vertiefung überführt.

4.2.2.3 *In vitro* Peptidkonzentrationen und unspezifische Stimulation

Es wurde eine Verdünnungsreihe der Peptide hergestellt und in Tripletts überführt. Wenn nicht anders bezeichnet, handelte es sich um die folgenden Peptidkonzentrationen des entsprechenden Peptidantigens: Es wurde mit einer Peptid-Konzentration von 100µg/ml begonnen und jeweils in 1:10-Schritten verdünnt zu 10, 1, 0.1 und 0.01µg/ml.

Die Hintergrundproliferation (Negativkontrollen) wurde an Tripletts festgestellt, die Zellen, aber kein Antigen enthielten. Als Positivkontrolle, d.h. als Kontrolle der Funktionalität und Proliferationsfähigkeit der Zellen, wurden folgende Substanzen zu den Zellen gegeben: 20ng/ml PMA und 500ng/ml Ionomycin.

4.2.2.4 Kulturbedingungen

Die Kulturplatten wurden unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator untergebracht: Temperatur 37°C, CO_2-Konzentration 5%, Luftfeuchtigkeit 95%.

4.2.2.5 Überstände zur Zytokinbestimmung, Zellernte, Proliferationsmessung

Nach dem Ausplattieren der Zellen (s. o.) wurde die Platte für 48h im Brutschrank inkubiert. Nach 48h wurde jeweils 100µl/Vertiefung des zellfreien Überstandes vorsichtig abgenommen und auf eine andere 96- Vertiefungen-Platte übertragen. Das ausplattierte Schema wurde dabei beibehalten. Die Überstände wurden zur Analyse des Zytokingehaltes im ELISA oder CTLL-2, IL-2 Bioassay abgenommen und bis zur weiteren Verwertung mindestens 48h bei -20°C aufbewahrt. Nach Abnahme der Überstände wurde 1µCi ^{3}H Thymidin (^{3}H THY)/ Vertiefung gelöst in 20µl RPMI zugegeben und die Zellen für weitere 16h inkubiert und dann für mind. 24h eingefroren. Zum Messen der Proliferation wurden die Zellen aufgetaut und auf einer Filterplatte geerntet und nach Zugabe von Szintilationflüssigkeit mittels eines Scintilations-ß-Counters die Inkorporation des ^{3}H THY gemessen. Jede Vertiefung auf der Platte wurde eine Minute lang gemessen, die gemessene Radioaktivität wurde als CPM (engl. counts per minute) ausgegeben.

4.3 Testsysteme

4.3.1 Messung der *in vitro* Serumstabilität der Peptide

Zur Messung der *in vitro* Serumstabilität wurde je 1mg Peptid in Mausserum aufgelöst und steril filtriert. Das Gemisch wurde bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50µl aus dem Peptid-Serum-Gemisch entnommen, in ein Röhrchen (Cryo-

tube) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Negativkontrolle wurden bereits nach kurzem Mischen entnommen (Zeitpunkt t = 0). Bis zur endgültigen Messung wurden die Proben bei -70°C aufbewahrt.
Für die Messung wurden die Proben nacheinander aufgetaut und mit HPLC-Methode gemessen (20µl/Injektion). Zur Berechnung der Konzentration wurde die Fläche des jeweiligen Peptid-Peaks ermittelt und mit der des Peaks bei t = 0 verglichen und in Prozent umgerechnet. Um Schwankungen auszugleichen wurde ein unabhängiger Peak (Referenzpeak), der sich unabhängig und konstant in Größe und Zeitpunkt seiner Erscheinung zeigte, herangezogen. Dieser Referenzpeak entsprach einem unbekannten endogenen Molekül aus dem Mausserum. Bei Schwankungen des Referenzpeaks wurden die entsprechenden Peptid-Peaks rechnerisch korrigiert.

4.3.2 Peptid Schnelltests (Screening)

In einem ersten Screening wurde die Wirkung von synthetisierten Peptiden auf DO11.10 Zellen getestet. Die Peptide wurden dafür auf einer Zellulosematrix synthetisiert und, wie in 3.4.2 beschrieben, weiterverarbeitet. Für die Assays wurden die Peptide aufgetaut und 2h lang gemischt. Jeweils 5µl Peptidlösung wurden in eine Vertiefung einer 96-Vertiefungen-Platte pipettiert (Endkonzentration ca. 1µg Peptid/ml). Bei jedem Test wurde das $OVA_{323-339}$ als Positivkontrolle mitgeführt. Aus DO11.10 Mausmilzen wurde eine Einzelzellsuspension bereitet. Jeweils $1x10^5$ Zellen /Vertiefung in 100µl Komplettmedium wurden zu den Peptiden hinzupipettiert. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die kein Peptid als Stimulus erhielten. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurde 1 µCi ^{3}H THY/ Vertiefung zugegeben und die Zellen nach weiteren 18h eingefroren. Wie in 4.2.2.5 beschrieben, wurden die Zellen geerntet und gemessen. Die Assays wurden 2-3 mal wiederholt

4.3.3 Versuchsablauf Toleranzinduktion

BALB/c bzw. transferierte BALB/c Mäuse (siehe 4.1.3) wurden an ***Tag 0*** mit dem jeweiligen Peptide i.v. in die laterale Schwanzvene gespritzt. Es wurden 300µg bzw. 100µg Peptid/Maus gelöst in 300µl/PBS injiziert (Gesamtvolumen 300µl/Maus). Die Kontrollmäuse, in der Regel 3-4, erhielten 300µl PBS/Maus i.v. (s. 4.1.1).
Als (positive) Kontrollgruppe dienten in allen Toleranz-Experimenten 2-3 Mäuse, die das WT Antigen $OVA_{323-339}$ in der gleichen Menge i.v. erhielten.
Nach der i.v.-Injektion der Peptide wurde über mehrere Tage beobachtet, ob die Tiere die Injektion gut vertrugen. An ***Tag 10, bzw. 32-33, bzw. Tag 53*** bekamen alle Mäuse eine s.c.

Injektion von 100µ $OVA_{323-339}$ in CFA pro Maus. 7 Tage nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die drainierenden Lymphknoten (s. 4.1.5) entnommen. Eine Einzelzellsuspension wurde bereitet und die Zellen mit verschiedenen $OVA_{323-339}$ Konzentrationen *in vitro* restimuliert. In der Regel wurden die Zellen jeder Maus getrennt von den Zellen anderer Tiere kultiviert und im Hinblick auf Toleranz untersucht. Nach 48h wurden, die Zellen wie unter 4.2.2.5 beschrieben, weiterbehandelt. Im Falle von **transferierten Mäusen** wurden am Tag der Tötung aus der bereiteten Einzelzellsuspension ca. $1x10^6$ Zellen entnommen und der FACS-Analyse zugeführt.

4.3.4 CTLL-2 / IL-2 Bioassay

Die CTLL-2 Zellen wurden 3-4 Tage nach Fütterung für die Detektierung des IL-2 aus Überständen der Zellkulturen eingesetzt. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen 3x mit Komplettmedium gewaschen, gezählt und in einer Konzentration von $2x10^4$/Vertiefung in 100µl auf eine 96- Vertiefungen-Rundbodenplatten ausplattiert. Die Platten mit Überständen wurden aufgetaut und auf 37°C aufgewärmt. 50µl Überstand wurden aus jeder Vertiefung aufgezogen und zu den CTLL-2 Zellen gegeben, das ausplattierte Schema wurde beibehalten. Auf jeder Platte wurde eine IL-2 Standardreihe (recombinantes Maus = rm IL-2) in Tripletts mitgeführt. Die IL-2 Verdünnungsreihe begann bei 50ng/50µl (1. Triplett) und wurde 1:4 bis zu 3pg/ 50µl (8.Triplett) verdünnt und zu den CTLL-2 hinzu pipettiert. Die Endkonzentration begann demnach bei 16ng/ml und endete bei 1pg/ml. Die Platten verblieben bei 37°C im Inkubator. Nach ca. 24h wurde 1µCi ^{3}H THY/Vertiefung in 20µl zugegeben. Die Platten wurden nach weiteren 12h Inkubation eingefroren. Proliferationsmessung s. 4.2.2.5. Die Zelllinie wurde im experimentfreien Intervall alle 3-4 Tage 1:5 geteilt und mit 10U/ml rmIL-2 gefüttert.

4.3.5 Zytokin -ELISA

Alle Zytokin-ELISA wurden nach der Sandwichmethode durchgeführt. Die Vertiefungen einer polymeren Matrix (96-Vertiefungen- Mikrotiterplatte aus Polyvinylchlorid) wurden mit dem Primärantikörper in PBS, 50µl/ Vertiefung über Nacht bei 4°C beschichtet. Ungebundener Primärantikörper wurde durch 3× Waschen mit Wasch-Puffer abgespült. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 0,5% (w/v) BSA in PBS, 200µl/ Vertiefung für 1h bei 37°C blockiert. Der Standard und die Kulturüberstände (50µl/ Vertiefung) wurden dazu pipettiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Je nach Zytokin wurde eine entsprechende Standardreihe mitgeführt. Standardreihen:

Rekombinantes Maus-Zytokin	IL-2	IL-4	INFγ	IL-10

Anfangskonzentration	100ng/ml	10ng/ml	10ng/ml	100ng/ml
Verdünnungsstufen/-faktor	8 / 3	8 / 3	8 / 3	8 / 3
Niedrigste Konzentration	0,05ng/ml	4pg/ml	4pg/ml	0,05ng/ml

Der Sekundärantikörper war stets an Biotin gekoppelt und wurde in 2µg/ml PBT gelöst, in 50 µl/ Vertiefung zugegeben und bei 37°C 1h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von Streptavidin (Extravidin, 1:1000 verdünnt in PBT, 50µl/ Vertiefung, 1h bei 37°C). Start der Farbreaktion durch Zugabe von Wasserstoffperoxid-H_2O_2. Hierfür wurde kurz vor Zugabe eine Lösung aus 10ml TMB-Puffer, einer Tablette TMB und 4 µl H_2O_2 frisch hergestellt und je 100µl pro Vertiefung rasch pipettiert. Je nach dem, wie weit die Färbung der Standardkurve fortschritt, wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 12,5%iger Schwefelsäure (50µl/ Vertiefung) beendet.

Es erfolgt ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Die Extinktion wurde bei 450 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen. Die Standardkurve mit Regressionslinie und die entsprechenden Zytokinkonzentrationen der Proben wurden mit Hilfe eines Computers ermittelt. Nach jeder Inkubation und nach dem Blocken wurden die Platten 5 bzw. 3x mit Wasch-Puffer abgespült.

4.3.6 Präsentation der Graphiken

Um die Ergebnisse untereinander besser vergleichen zu können, wurde eine Standardisierung der Präsentation durchgeführt. Prinzipiell wurden alle Mäuse einer Gruppe zu einem Graph zusammengefasst. Die Präsentation der Werte innerhalb einer Graphik wurden in % von PBS max angegeben. PBS max ist dabei der maximal erreichte CPM-Wert (~ höchste ^{3}H THY Aufnahme) der Lymphknotenzellen von Mäusen, welche PBS erhalten hatten (Negativkontrollen). Jeder Wert innerhalb des gezeigten Experimentes wurde auf PBS max bezogen und in % von PBS max (zuzüglich des Standardfehlers SEM) angegeben. Diese Standardisierung wurde auch für die Präsentation der IL-2 Bioassays durchgeführt.

4.3.7 Festlegung der Toleranzkriterien

Um die Dosis/Immunantwort-Kurven zu erstellen, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus den drei Einzelwerten für jeden Messzeitpunkt gebildet und in einem x/y-Diagramm aufgetragen. Auf der logarithmisch skalierten x-Achse wurde die Antigenkonzentration in µg/ml und auf der linear skalierten y-Achse wurden die CPM angegeben. Das Kriterium dafür, ob eine Maus, die mit Peptid i.v. injiziert wurde, tolerant war, wurde folgendermaßen festgelegt:

Zunächst wurde die Dosis/Immunantwort-Kurve der Kontroll-Mäuse betrachtet. Unabhängig

davon, ob es sich nur um die Beurteilung der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten oder um das IL-2 Bioassay handelte, wurde der Maximalwert (in cpm) ermittelt. Dieser Wert wurde halbiert und dann die zu diesem Halbmaximalwert gehörige Antigenkonzentration abgelesen. **Eine mit Peptid injizierte Maus wurde dann als tolerant angesehen, wenn sie mindestens 50mal mehr Antigen als die Kontrolle benötigte, um diesen Halbmaximalwert zu erreichen**. Bei der Betrachtung der IL-2 Sekretion im CTLL-2 Bioassay, wurde die Toleranzschwelle ebenfalls auf 50 fach gesetzt. Abbildung 4.1 soll die Festlegung des Toleranzkriteriums veranschaulichen.

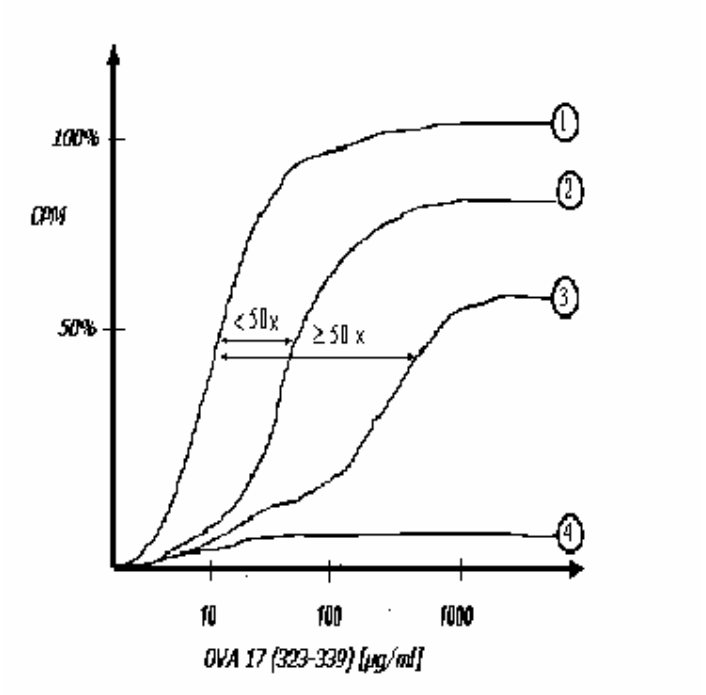

Abbildung 4.1: **: Schema zur Veranschaulichung des Toleranzkriteriums.**
Halblogarhithmische Darstellung. Kurve 1 stellt die Dosis/ Immunantwort der PBS-Kontrolle dar. Die Menge an inkorporiertem ^{3H}-Thymidin steigt mit zunehmender Ag-Konzentration. Kurve 2 ist eine nicht-tolerante Peptid i.v. behandelte Maus, die weniger als die 50fache Ag-Menge der PBS-Kontrolle zum Erreichen des Halbmaximalwerts benötigt. Kurve 3 steigt zwar mit zunehmender Ag-Konzentration, der „shift“ beim Halbmaximalwert ist jedoch größer/gleich 50mal. Maus 3 ist in diesem Fall tolerant. Bei Maus 4 ist der Shift so groß, dass der Halbmaximalwert nicht mehr im Rahmen des Diagramms erreicht wurde. Maus 4 ist ebenfalls tolerant.

4.3.8 FACS-Analyse mit Durchflußcytometrie

4.3.8.1 Prinzip und Durchführung

Die Durchflußcytometrie gestattet es, durch Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen Zellpopulationen in einem flüssigen Medium voneinander zu unterscheiden und zu charakteri-

sieren. Die Lichtstreuung erfolgt in Vor- und Seitwärtsrichtung (engl. forward- und sidewart-scatter). Zusätzlich zur Streulichtmessung ist die Registrierung von Fluoreszensemissionen möglich. Zur weiteren Differenzierung der Zellen wurden diese mit Farbstoff gekoppelten Antikörpern (AK) beladen werden. Die AK richteten sich dabei spezifisch gegen CD4 und OVA-T-Zellrezeptor (siehe 3.4.1.1). Durch Bestrahlung mit monochromatischem Licht wurden diese Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt. Zur Analyse wurde 1 ml der Zellsuspension (ca. $1x10^6$ Zellen) in ein Probenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden einzeln mit einem fokussierten Argon-Laser (488 nm, 200 mW) durchstrahlt und die Streulicht- und Fluoreszenzsignale gemessen. Über einen angeschlossenen Computer wurden die Messdaten verarbeitet und gespeichert (Software: CellQuest®; Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Von jeder Zelle wurden die folgenden fünf Parameter analysiert :

PARAMETER	BEMERKUNG
Vorwärtslichtstreuung (FSC=Forward Scatter 2-10° zum einfallenden Licht),	proportional zur Zellgröße
Seitwärtslichtstreuung (SSC=Sideward Scatter; 90° zum einfallenden Licht)	proportional zur Oberflächenstruktur (Membranfaltung) und Granularität der Zelle
Fluoreszenzintensität 1 (FL 1)	proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). FITC hat ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 520 nm und 530 nm.
Fluoreszenzintensität 2 (FL 2)	proportional zu der Intensität der Anfärbung einer Zelle mit R-Phycoerythrin (PE). Dieses hat ein Absorptionsmaximum von 488 nm und ein Emissionsmaximum zwischen 570 und 576 nm.
Fluoreszenzintensität 3 (FL 3)	proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit Propidiumiodid (PI), αDIG-Cy5 oder SA-PerCP. PI hat ein Absorptionsmaximum von 536 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm. αDIG-Cy5 hat ein Absorptionsmaximum zwischen 625 und 650 nm und ein Emissionsmaximum von 670 nm. SA-PerCP hat ein Emissionsmaximum von 680 nm.

Mit Hilfe der Software lassen sich alle oben aufgeführten Parameter in einem Diagramm gegeneinander darstellen. (Zellen jeweils als Punkte dargestellt). Um aussagekräftige Werte zu

erhalten, wurden in der Regel 5x 10^4 Zellen, bei geringer Frequenz der gesuchten Population 1x 10^5 Zellen ausgewertet (siehe Abbildung 5.7: ff).

4.3.9 Oberflächenfärbung

Die Zellsuspension wurde, wie in 4.2.1 beschrieben, hergestellt. 1x10^6 Zellen wurden entnommen und bei 150 × *g* 8-10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment wurde durch Zugabe von jeweils 1ml FACS-Puffer und erneutes Zentrifugieren gewaschen, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Unspezifische Bindungen wurden blockiert durch Inkubation der Zellen mit Normal-Maus-Serum (1:10 verdünnt in PBS/0,5% (w/v) BSA) in 50µl Volumen für 10 min auf Eis. Danach wurde der Antikörper zugefügt, geschüttelt und in einem 100µl-Endvolumen für 15 min bei 4°C (auf Eis) inkubiert. Anschließend wurde 1ml FACS-Puffer zupipettiert und ungebundene AK durch 2maliges Waschen entfernt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit dem Sekundärfarbstoff wiederum für 15 min auf Eis inkubiert und 1x mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 500µl - 1ml FACS-Puffer aufgenommen und am FACScan® analysiert. Direkt vor der Messung wurde jeweils 1µl Propidiumiodid (PI) hinzu pipettiert (Markierung toter Zellen).
Als Kontrollen der Doppelfärbung bzw. Dreifachfärbung dienten Einzelfärbungen.
Folgende Farbstoff-Konjugate wurden eingesetzt:

Fluoreszenz	Antikörper
FL1	**KJ1-26.1-FITC**
FL2	**Anti-CD4-PE**
FL3	**(PI)**

4.4 Statistik

Sämtliche in den Experimenten ermittelten Werte (z.B. Proliferation in Tripletts) wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.
Der Standardfehler wurde nach folgender Formel berechnet:

$$SEM = \frac{\sqrt{n\sum x^2 - \left(\sum x\right)^2}}{n^2}$$

Dabei steht SEM für engl.: standard error of the Mean und wird aus dem Mittelwert x aus n Einzelwerten gebildet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Excel® von Microsoft® und dem Programm PRISM® von GraphPad® durchgeführt.

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Teile. Zunächst werden die Ergebnisse der *in vitro* Versuche und anschließend die Ergebnisse der *in vivo* Experimente gezeigt.

In vitro wurde zunächst ein minimales Epitop aus dem Peptid $OVA_{323-339}$ (Aminosäuresequenz = ISQAVHAAHAEINEAGR) durch systematische Verkürzung identifiziert. Anschließend wurde in das verkürzte Epitop in mehreren sukzessiven Schritten D-Aminosäuren eingebracht. Von ausgewählten Peptiden wurde *in vitro* die Stabilität in Mausserum (als Serumstabilität) bestimmt.

5.1 *In vitro* Versuche

5.1.1 $OVA_{327-337}$ ist ein potentes minimales Epitop am DO11.10 T-Zellrezeptor

Zunächst wurde versucht, ein in seiner Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) möglichst kurzes Peptidepitop zu finden. Wir zogen hierfür das bekannte Peptidepitop $OVA_{323-339}$ (Aminosäuresequenz = ISQAVHAAHAEINEAGR) des Hühnereiweiß (im Weiteren auch als $OVA_{323-339}$ bezeichnet) heran und versuchten, es auf ein minimales Epitop zu verkürzen. Das minimale Epitop sollte sich im Idealfall dadurch auszeichnen, dass es bis auf ein notwendiges Maß (Länge) an Aminosäuren verkürzt werden kann, ohne dabei seine Antigenität zu verlieren. Als Maß der Antigenität der gekürzten OVA-Epitope wurde die Proliferation von $OVA_{323-339}$ – spezifischen DO11.10 T-Zellen herangezogen.

In den Verkürzungsanalysen wurde $OVA_{323-339}$ jeweils von einem Ende her um eine Aminosäure (AS) verkürzt (Siehe auch 4.3.2.). Die gezeigten Peptide wurden Zellulose gebunden synthetisiert, vom Träger abgespalten und für die Proliferationsassays in Lösung gebracht. Tabelle 5.1 zeigt das zusammengefasste Ergebnis der Verkürzungsanalysen.

Tabelle 5.1: **Verkürzungsanalyse des** $OVA_{323-339}$
Verkürzungsanalyse von $OVA_{323-339}$. Aufgeführt sind die AS-Sequenzen der getesteten Peptide und ihre Position im $OVA_{323-339}$ Peptid. $OVA_{323-339}$ wurde zunächst C-terminal (oberer Teil der Tabelle), dann N-terminal um eine Aminosäure verkürzt. Im unteren Teil wurden einige Peptide von beiden Seiten her verkürzt. DO11.10 Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden stimuliert und die gemessene Proliferation in CPM (counts per minute) angegeben. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, die gezeigten Werte stellen den Mittelwert aus den drei Experimenten dar, in der Spalte SEM (Standard Error of Mean) ist der Standardfehler angegeben. Das Originalpeptid $OVA_{323-339}$ wurde als Positivkontrolle mitgeführt (besonders gekennzeichnet). Die Negativkontrollen (Zellen ohne Peptid) proliferierten je nach Experiment zwischen 100 und 350 CPM (nicht gezeigt). Offensichtlich wichtige Positionen in der Sequenz von $OVA_{323-339}$ wurden grau unterlegt. Rechts ist die entsprechende Anzahl der AS des jeweiligen Peptides aufgeführt.

	Position in $OVA_{323-339}$																			
	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	MW [CPM]	SEM [CPM]	Anzahl AS
Nr.																				
Original	**I**	**S**	**Q**	**A**	**V**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**	**G**	**R**	**53391**	**22369**	**17**
2		S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	53191	29652	16
3			Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	50261	33181	15
4				A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	48289	32655	14
5					**V**	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	39681	28555	13
6						**H**	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	23230	27742	12
7							A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	3955	5363	11
8								A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	1632	1996	10
9									H	A	E	I	N	E	A	G	R	2851	1589	9
10										A	E	I	N	E	A	G	R	23524	30483	8
Original	**I**	**S**	**Q**	**A**	**V**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**	**G**	**R**	**53391**	**22369**	**17**
12	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G		48279	32581	16
13	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	E	**A**			45215	31320	15
14	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	**E**				27598	28035	14
15	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N					10348	13453	13
16	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I						1099	1352	12
17	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E							264	39	11
18	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A								334	151	10
19	I	S	Q	A	V	H	A	A	H									324	147	9
20	I	S	Q	A	V	H	A	A										293	126	8
21		S	Q	A	V	H	A	A										370	100	7
22	I	S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E							449	205	11
23		S	Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I						1722	1401	11
24			Q	A	V	H	A	A	H	A	E	I	N					14428	11558	11
25				A	V	H	A	A	H	A	E	I	N	**E**				53139	20884	11
26					**V**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**			**46606**	**29307**	**11**
27						H	A	A	H	A	E	I	N	E	A	G		31015	22113	11
28							A	A	H	A	E	I	N	E	A	G	R	7226	5187	11

Wie die Tabelle 5.1 zeigt, konnten DO11.10 Zellen auch mit deutlich kürzeren Epitopen ausreichend stark stimuliert werden. Die Entfernung der Aminosäuren an den Positionen 327, 328 und 336, 337 ergab einen deutlichen Proliferationsrückgang. Für die weiteren Experimente wählten wir das Peptid Nr. 26 ($OVA_{327-337}$, VHAAHAEINEA, ein 11mer). Dieses Peptid zeichnet sich durch ein Minimum an AS bei voll erhaltener stimulatorischer Potenz aus. Im Weiteren wird dieses Peptid (Nr. 26 der Tabelle 5.1) als $OVA_{327-337}$ bezeichnet.

Austausch von L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren in $OVA_{327-337}$

Um die Stabilität der Peptide gegenüber Proteasen zu erhöhen, begannen wir nun mit dem

Austausch der ursprünglichen L-AS durch D-Aminosäuren.

Jede AS in $OVA_{327-337}$ wurde in einem separaten Schritt durch jede mögliche, rechtsdrehende Aminosäuren (D-AS) ersetzt. Als Maß der Antigenität der synthetisierten Peptide wurde erneut die Proliferation von $OVA_{323-339}$ spezifischen DO11.10 Zellen herangezogen, welche mit dem betreffenden Peptid stimuliert wurden (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: **Substitutionanalyse I:**
Ausgehend von der originalen AS-Sequenz von $OVA_{327-337}$ (VHAAHAEINEA), wurde jede einzelne Position durch jede mögliche D-AS ersetzt. In der linken Spalte (1. Spalte) sind die eingesetzten D-AS gezeigt. Die Spalten 2 bis 12 zeigen die Position, in die ausgetauscht wurde. Zur Orientierung sind die Positionen im Gesamtprotein des Hühnereiweiß angegeben (Ausgangspeptid). DO11.10 Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden stimuliert und die gemessene Proliferation in CPM (counts per minute) angegeben. Positivkontrollen wurden mit $OVA_{327-337}$ stimuliert. Der Mittelwert lag hier bei 21098 +/- 7881 SEM. Die Proliferation der Negativkontrollen (Zellen ohne Peptid) lag zwischen 173 und 1132. Grau unterlegt sind Peptide, welche mit Werten über 24500 CPM (willkürliche gesetzter Schwellenwert) als interessant eingestuft wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten. *Da für Glycin (G) kein Stereoisomer existiert (keine rechtsdrehende Form möglich), wurden die Ergebnisse nicht in weitere Analysen miteinbezogen

	Position in $OVA_{327-337}$										
	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
Original	**V**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**
D-AS											
a	22745	5708	2375	5314	1268	2917	674	4358	3711	9848	2214
c	22943	4752	6133	9694	4933	10650	2440	3348	1422	7206	2995
d	16058	5994	1585	6448	5552	5935	1812	2661	1038	10740	2494
e	19107	6624	3550	7639	5595	6339	6209	3146	976	19897	3138
f	27863	6376	4065	6424	7017	11121	4058	2872	921	15677	4885
G*	*27041*	*20243*	*13790*	*21406*	*3371*	*18852*	*2077*	*22899*	*3279*	*44636*	*30795*
h	25248	16804	9032	13685	3930	17544	**26254**	1660	2507	**37740**	7699
i	30937	11627	3558	14826	1529	8622	2186	2582	1451	15431	3355
k	34699	**24725**	4201	16982	1711	6534	1727	279	1497	13999	5464
l	30385	8949	8224	6251	2432	4969	1457	504	1406	11494	3547
m	32771	7021	16841	7590	927	9667	1898	1371	1309	8005	2286
n	31109	9265	12286	17880	2257	6409	923	1005	5236	10763	2377
p	20261	7910	3780	19666	1242	4451	1414	1056	892	11831	13109
q	34514	6694	4753	11753	1391	5388	1030	1437	5079	11955	3387
r	20361	16532	14570	21755	1735	12227	2851	1811	1343	24028	4381
s	23916	12605	7311	11864	1112	4010	920	1369	1813	8940	314
t	36644	11402	5600	8632	495	5482	933	1342	1594	12230	350
v	30041	8428	5617	6454	896	3085	489	1007	1893	6103	403
w	24604	5198	6194	3064	354	3735	658	622	1835	10330	249
y	**34759**	3726	5047	10467	475	7781	739	286	1996	17533	312
Original	**V**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**
	$OVA_{327-337}$ 21098										

In den durchgeführten Substitutionsanalysen wurde pro Durchgang nur jeweils eine Position ausgetauscht. Aus Tabelle 5.2 lässt sich entnehmen, dass die Position 327 durch nahezu jede D-AS ersetzt werden konnte, ohne das es zu einem Wirkungsverlust kam. Besonderes Augenmerk kam deshalb Substitutionen im Zentrum des Peptides zu. Die Festsetzung eines Schwellenwertes sollte weiterhin die Anzahl der ausgewählten Peptide auf ein überschaubares Maß beschränken. Aufgrund der Ergebnisse aus den gezeigten Stimulations-Versuchen wurden demnach folgende Epitope als interessant angesehen: yHAAHAEINEA, VkAAHAEINEA, VHAAHAhINEA, VHAAHAEINhA und zusätzlich VHAAHAEINEp, VHmAHAEINEA, und VHApHAEINEA. Diese Peptide wurden nochmals konventionell synthetisiert, aufgereinigt und in verschiedenen

Verdünnungen mit DO11.10 Zellen inkubiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Epitop mit der Sequenz yHAAHAEINEA erbrachte hierbei die besten Proliferationsergebnisse und wurde als Ausgangssequenz für weitere Substitutionsanalysen ausgewählt (siehe Tabelle 5.4). Das Peptid VHAAHAhINEA erbrachte die schlechtesten Ergebnisse und wurde deshalb nicht für weitere Versuche ausgewählt.

Tabelle 5.3: **Substitutionsanalyse II**
Ausgehend von dem Epitop mit der AS-Sequenz yHAAHAEINEA wurde jede einzelne Position durch jede mögliche D-AS ersetzt. In der linken Spalte (1. Spalte) sind die eingesetzten D-AS gezeigt. Spalten 2 bis 12 zeigen die Position, in die ausgetauscht wurde. Zur Orientierung sind die Positionen im Gesamtprotein des Ovalbumins angegeben. DO11.10 Zellen wurden mit den entsprechenden Peptiden stimuliert und die gemessene Proliferation in CPM (counts per minute) angegeben. Als Positivkontrolle wurde das $OVA_{327-337}$ mitgeführt, der Mittelwert lag hier bei 40986 CPM +/- 6010 SEM. Die Proliferation der Negativkontrollen (Zellen ohne Peptid) lag im Mittel bei 273 CPM. Grau unterlegt sind Peptide, welche mit Werten über 21000 CPM (willkürlich gesetzter Schwellenwert) als interessant eingestuft wurden. Der Versuch wurde 2mal wiederholt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. *Da für Glycin (G) kein Stereoisomer existiert, wurden die nicht in weiteren Analysen miteinbezogen.

	Position in $OVA_{327-337}$										
	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
Original	**y**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**
D-AS											
a	36310	454	974	559	667	601	386	872	495	5856	925
c	26716	16033	5719	606	461	491	331	1391	585	2105	2268
d	37258	968	742	441	1134	446	451	429	464	1722	1037
e	31345	461	738	490	457	536	305	901	433	4866	598
f	60031	2721	545	838	480	807	506	481	412	9641	618
G*	*23240*	*33461*	*5327*	*34990*	*467*	*6943*	*507*	*360*	*1352*	*18532*	*24331*
h	47929	13351	4975	872	5027	1289	569	574	2820	16774	1102
i	45324	1468	1709	879	611	2843	453	431	892	6196	441
k	38795	796	1379	378	463	680	973	471	544	4042	1190
l	57048	1580	363	580	377	394	464	416	439	1491	388
m	51580	433	487	398	428	6445	543	420	542	2611	1317
n	55894	**46646**	13220	4146	549	3793	8016	607	7857	17172	485
p	51113	1173	601	1644	493	782	469	539	613	17295	840
q	54575	6638	594	1897	678	769	635	583	553	**22397**	2238
r	53909	4201	2402	748	817	841	423	1209	602	5464	806
s	23715	650	1403	427	407	2011	330	496	2841	3187	1758
t	20537	2756	618	1013	418	473	590	444	436	6068	602
v	38899	1767	604	765	512	835	337	447	464	13645	562
w	41426	20673	489	375	538	558	407	459	431	19442	3653
y	49913	3189	840	833	477	508	451	535	443	7135	**25746**
Original	**y**	**H**	**A**	**A**	**H**	**A**	**E**	**I**	**N**	**E**	**A**
	$OVA_{327-337}$ 40986										

Aus Tabelle 5.3 lässt sich entnehmen, dass erneut die Position 327 durch nahezu jede D-AS ersetzt werden konnte, ohne dass es zu einem Wirkungsverlust kam. Die grau unterlegten Substitutionen wurden im Anschluss konventionell synthetisiert(ynAAHAEINEA, yHAAHAEINqA, yHAAHAEINEy) und DO11.10-Maus-Milzzellen damit stimuliert (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesen drei Peptiden wurde daraufhin die Sequenz yHAAHAEINqA als Ausgangssequenz für die nächste Substitutionsanalyse ausgewählt. Dieses Peptid induzierte in diesem Test die stärkste Proliferation im Vergleich zu den anderen zwei genannten. Das Peptid wird im Weiteren als $OVA_{(327-337)327y,336q}$ bezeichnet.

In weiteren Experimenten (nicht gezeigt) wurde versucht, eine weitere Substitution in das

yHAAHAEINqA-Epitop einzuführen. Interessanterweise konnte in diesen Experimenten keine vergleichbare Proliferation erzielt werden. Es zeigte sich hier bei allen weiteren Peptiden ein dramatischer Verlust der stimulatorischen Potenz verglichen zu dem Ausgangspeptid. Aufgrund der Beobachtung, dass Alanin (A) in Position 337 wichtig für die Aktivierung der DO11.10 Zellen zu sein scheint, wurde diese Position in einem weiteren Experiment konserviert und, um das Peptid gegen Carboxypeptidasen zu schützen, willkürlich ein D-Alanin (a) als Position 338 angehängt (Sequenz = yHAAHAEINEAa, ein 12mer). Dieses Peptid stimulierte DO11.10 Zellen etwa ebenso stark wie es das Originalepitop $OVA_{323-339}$ vermochte. Das Peptid wird im Weiteren als $OVA_{(327-338)327y,338a}$ bezeichnet.

5.1.2 *In vitro* Wirkung von ausgewählten D-Peptiden auf DO11.10 Zellen

Um sicherzustellen, dass die ausgewählten Peptide alle rein agonistische Wirkung besitzen, wurde neben der Proliferation hier auch das induzierte Zytokinmuster der stimulierten DO11.10 Zellen in vitro untersucht. Die ausgewählten Peptide aus den oben genannten Analysen wurden dazu konventionell synthetisiert, aufgereinigt und DO11.10 Zellen damit stimuliert. Die Messung der Proliferation der DO11.10 Zellen diente dabei als Maß für die Aktivierungspotenz der eingesetzten Peptide. Da bekannt ist, dass Peptidepitope einen Wechsel des Verhaltensmusters in T-Zellen induzieren können, wurde ebenso das Zytokinsekretionsmuster der stimulierten DO11.10 Zellen untersucht. Es sollte hierbei festgestellt werden, ob die verwendeten Peptide evtl. einen (unerwünschten) Wechsel von Th1 (Produktion von IL-2, INFγ) zu Th2 (Produktion von IL-4) induzieren. Abbildung 5.1 zeigt exemplarisch die Ergebnisse.

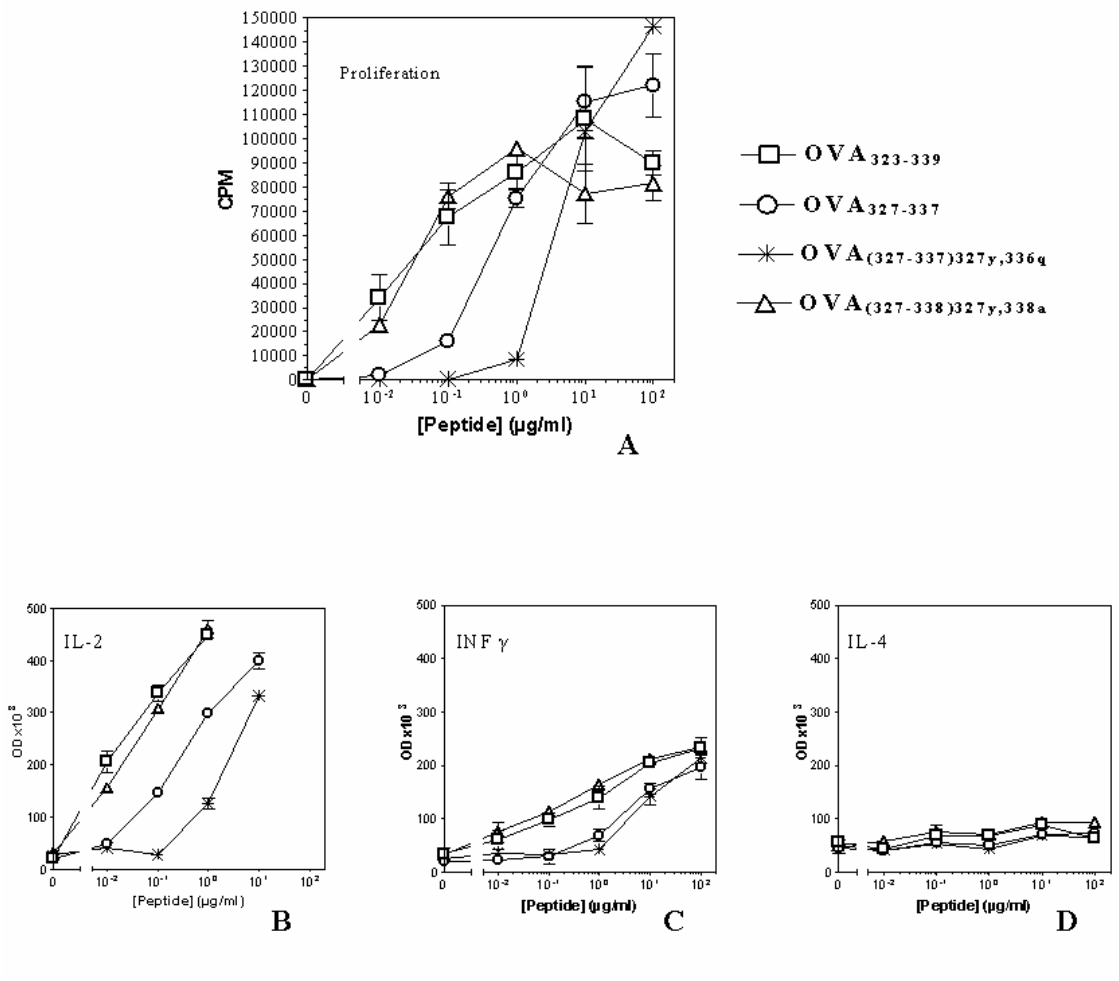

Abbildung 5.1: **in vitro Wirkung der OVA-Peptide auf DO11.10 Zellen im Vergleich**

DO11.10-Maus Milzzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Peptid stimuliert und die Proliferation in CPM gemessen (**A**). Überstände aus **A** wurden in ELISA-Analysen auf den Gehalt an IL-2 (**B**), INFγ (**C**) bzw. IL-4 (**D**) überprüft. OD = optical density ($x10^{-3}$). Jeder gezeigte Punkt auf der Kurve ist das Mittel aus drei Einzelmessungen (Tripletts) mit SEM. Gezeigt ist eines von zwei vergleichbaren Ergebnissen. Untere Nachweisgrenze für IL-2 ca. 45pg/ml, für INFγ ca. 102pg/ml, für IL-4 ca. 4,5pg/ml.

Auf Stimulierung mit den hier gezeigten Peptiden reagierten DO11.10 Zellen mit dem gleichen Aktivierungsmuster. Je nach Potenz der Peptide konnte eine unterschiedlich starke Proliferation, IL-2- und INFγ- Sekretion beobachtet werden. Die Menge an sezernierten Zytokinen korrelierte dabei mit der beobachteten Proliferation. IL-4 ließ sich nur spärlich detektieren. Mit gleichen Ergebnissen wurden weiterhin die Peptide $OVA_{328-336}$ (HAAHAEINE), $OVA_{(327-337)327y}$ (yHAAHAINEA) und $OVA_{(327-337)327y337y}$ (yHAAHAEINEy) getestet, die Ergebnisse dieser Experimente sind unten in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

5.1.3 Die *in vitro* Serumstabilität der D-Peptidepitope zeigt sich in einer deutlich verlängerten Serumhalbwertszeit

Ziel dieser Arbeit war, Peptidepitope zu definieren, welche eine verlängerte Serumhalbwertszeit (Serum HWZ) aufweisen, um deren Verhalten in der *in vivo* Induktion peripherer T-Zelltoleranz zu beobachten. Zur Bestimmung der Serumhalbwertszeit wurden ausgewählte Peptidepitope in Mausserum inkubiert und der Restgehalt zu bestimmten Zeitpunkten mittels HPLC ermittelt (siehe auch 4.3.1). Abbildung 5.2 illustriert die Ergebnisse der Serum HWZ Messungen (*in vitro*).

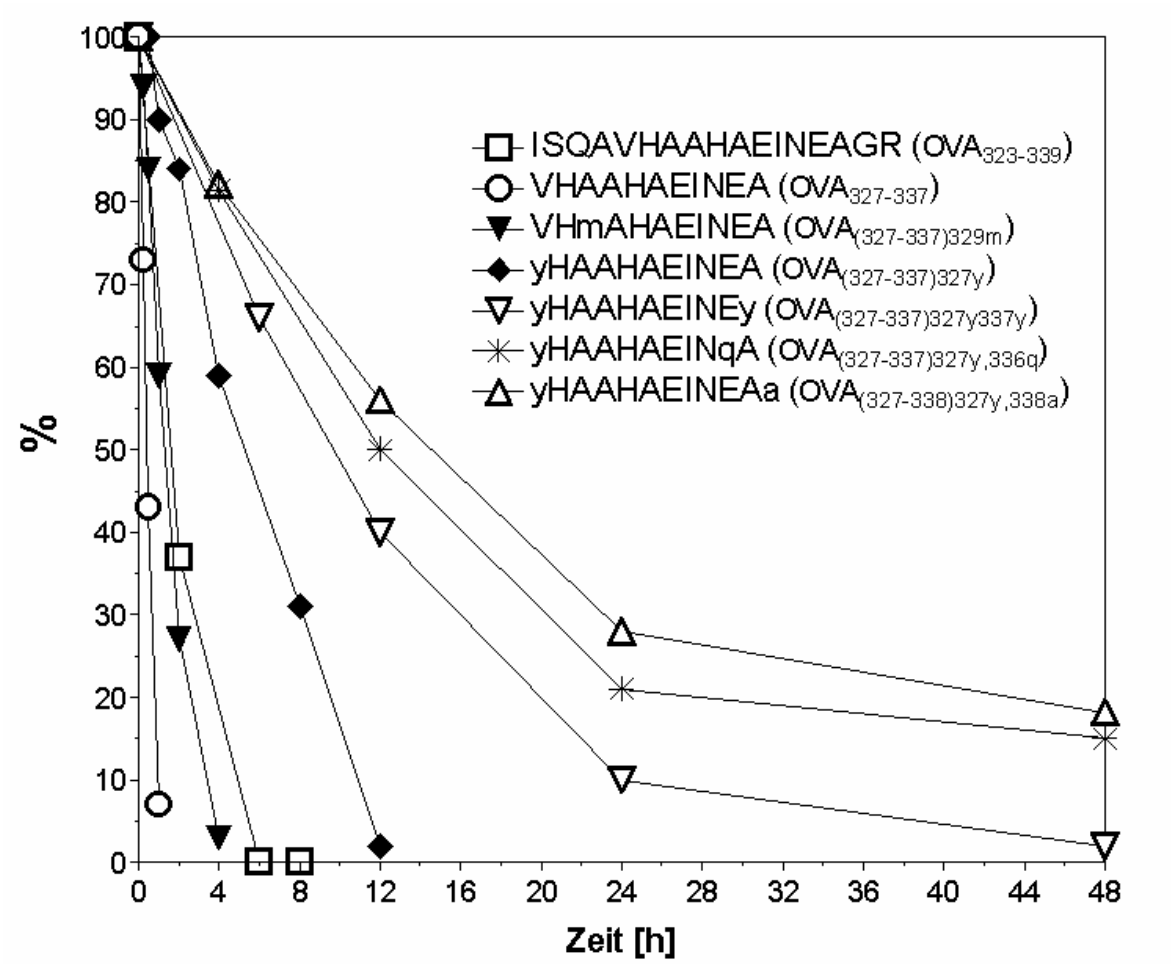

Abbildung 5.2 ***in vitro* Serumstabilität, Peptide im Vergleich**

Die gezeigten Peptidepitope wurden in Mausserum gelöst und ihre Konzentration zu den angegeben Zeitpunkten mittels HPLC bestimmt (s.a. 4.3.1).

Tabelle 5.4: **Übersicht Peptide im Vergleich (Proliferation und *in vitro* Serumhalbwertszeit)**
Übersicht über die eingesetzten Peptidepitope in ihrer stimulatorischen Potenz auf DO11.10 Zellen (bzw. DO11.10-Maus Milzzellen) unter Angabe der betreffenden *in vitro* Serumhalbwertszeit (s.a. 5.1.3). Die Peptidkonzentration bei halbmaximaler Proliferation ergeben sich aus den Experimenten in 5.1.2 (einige Peptide nicht gezeigt) und wurden Proliferations- und Zytokindiagrammen entnommen. Gezeigt ist die Konzentration in µg/ml an zugegebenem Peptid bei der DO11.10 Zellen die halbmaximale Proliferation von $OVA_{323-339}$ erreichten.

Kürzel	Sequenz	Halbmax. Wirkung von $OVA_{323-339}$ ca. Konz. [µg/ml]	Serumhalb-wertszeit (ca.)
$OVA_{(327-338)327y,338a}$	**y**HAAHAEINEA**a**	$2x10^{-2}$	**14h**
$OVA_{323-339}$	ISQAVHAAHAEINEAGR	$2x10^{-2}$	**1.75 h**
$OVA_{327-337}$	VHAAHAEINEA	$3x10^{-1}$	**0.75h**
$OVA_{(327-337)327y}$	**y**HAAHAEINEA	$3x10^{-1}$	**5.5h**
$OVA_{(327-337)327y,336q}$	**y**HAAHAEIN**q**A	$2x10^{0}$	**12h**
$OVA_{(327-337)327y337y}$	**y**HAAHAEINE**y**	$2x10^{1}$	**10h**
$OVA_{328-336}$	HAAHAEINE	$3x10^{0}$	Nicht getestet

Die D-Peptidepitope zeigten verglichen mit den herkömmlichen Peptiden eine deutlich verlängerte *in vitro* HWZ. Beispielsweise zeigte $OVA_{(327-337)327y,336q}$ gegenüber $OVA_{327-337}$ bei gleicher AS-Anzahl aber nach Einbau von zwei D-AS eine ca. 20fach verlängerte HWZ.

5.2 *In vivo* Versuche

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte das Verhalten der D-Aminosäuren-substituierten Peptide *in vivo* näher studiert werden. In Bezug auf einen künftigen Einsatz von D-Peptiden in der Therapie autoimmuner Erkrankungen sollten Vor- bzw. Nachteile dieser Peptide *in vivo* beobachtet und beschrieben werden.

Grundsätzlich sollten die durchgeführten Toleranz-Experimente folgende Fragen beantworten:

Kann durch eine i.v. Injektion von D-Peptid T-Zelltoleranz induziert werden?

Auf welche Art wird Toleranz induziert (z.B. Anergie oder Deletion) ?

Wie verhält sich die Toleranzinduktion bei Dosisreduktion und hat die Serumstabilität darauf Einfluss?

Wie lange hält die induzierte Toleranz an und hat die Serumstabilität hierauf einen Einfluss?

5.2.1 Das minimale Epitop $OVA_{327-337}$ induziert immunologische Toleranz gegenüber $OVA_{323-339}$ *in vivo*

Zunächst war von Interesse, ob es möglich ist, mit dem minimalen Epitop $OVA_{327-337}$ Toleranz zu induzieren. Als Vergleich dienten Mäuse, die das Originalepitop $OVA_{323-339}$ injiziert bekamen (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle dienten Mäuse, denen kein Peptid (bzw. PBS

ohne Peptid) gespritzt wurde. Siehe auch die Abschnitte 4.3.3 und 4.3.7.
Als Maß der induzierten T-Zelltoleranz mittels Peptid i.v. Injektionen diente die verminderte Proliferation und IL-2 Sekretion der Lymphknotenzellen behandelter Mäuse, nach Restimulation der Zellen ex vivo. Die i.v. Injektion von 300µg $OVA_{327-337}$ führte zur Toleranz gegenüber dem Wildtyp-Epitop (WT-Epitop) $OVA_{323-339}$. Die Lymphozyten der mit $OVA_{323-339}$ bzw. $OVA_{327-337}$ gespritzten Mäuse reagierten auf die s.c. Immunisierung mit $OVA_{323-339}$ mit verminderter Proliferation und IL-2 Sekretion. Im Gegensatz dazu zeigten die PBS behandelten Mäuse (Negativkontrollen) auch in Bereichen niedriger Restimulation deutlich erhöhte Werte bezüglich Proliferation und IL-2 Sekretion (im Vergleich zu absolut unbehandelten Mäusen). Peptid behandelte Mäuse benötigten über 50x mehr Peptid um eine vergleichbare Proliferation oder IL-2 Sekretion zu erreichen. Das Verhalten der mit Peptid gespritzten Mäuse (Lymphozyten) entsprach damit jenem von toleranten Mäusen.

5.2.2 Induktion peripherer Toleranz mittels D-Peptid-Epitope

Die D-Peptide wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, durch eine i.v. Injektion Toleranz in BALB/c zu induzieren. Folgende Peptide wurden intravenös appliziert, und das Verhalten der injizierten Mäuse beobachtet: $OVA_{(327-337)327y,336q}$ (yHAAHAEINqA) und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ (yHAAHAEINEAa). Als Positivkontrollen dienten BALB/c, welche $OVA_{323-339}$ (ISQAV-HAAHAEINEAGR) i.v. erhielten, die Negativkontrollen erhielten kein Peptid i.v. (bzw. PBS alleine) Abbildung 5.3 zeigt die Ergebnisse.

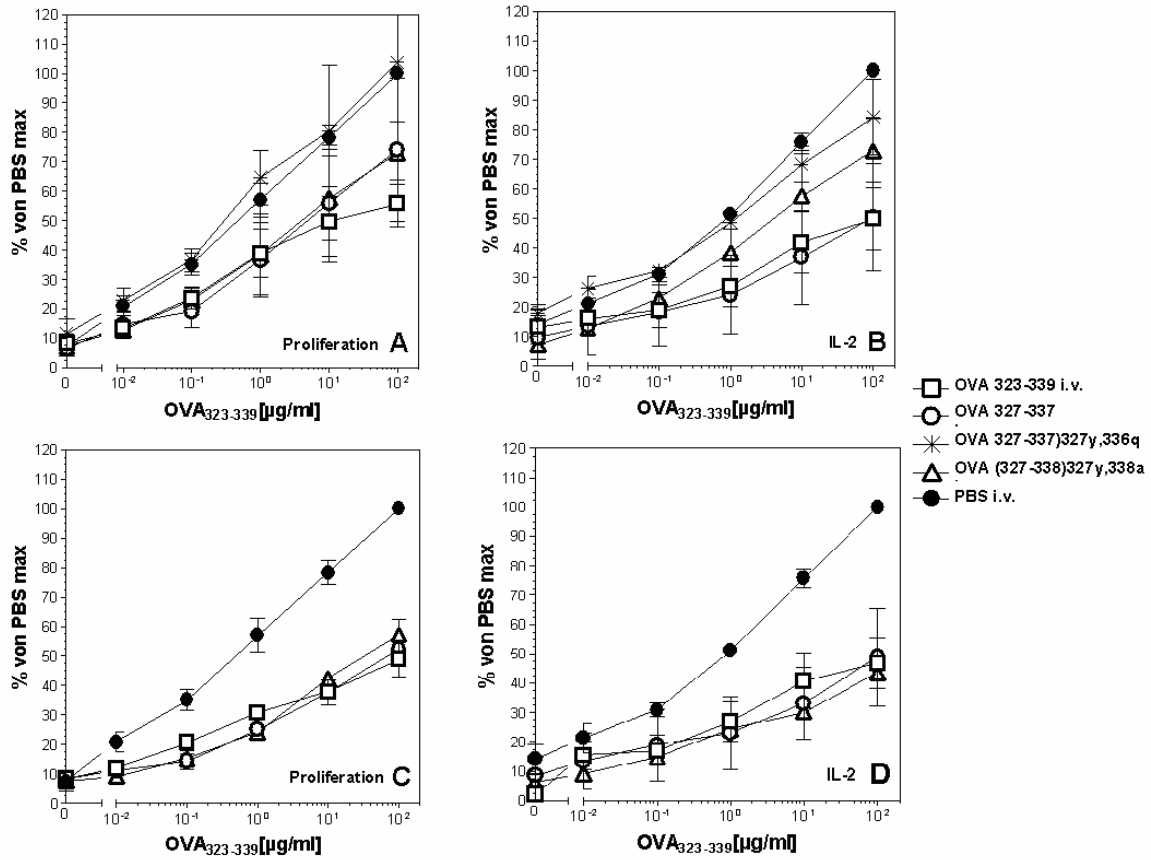

Abbildung 5.3: Zusammenfassung Toleranzinduktion mit D-AS substituierten Peptiden
BALB/c Mäuse bekamen entweder 300µg $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$, $OVA_{(327-338)327y,338a}$ oder $OVA_{(327-337)327y,336q}$ i.v.. Die Negativkontrollen erhielten PBS alleine. Alle Mäuse wurden an Tag 10 post i.v. mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA immunisiert und am Tag 17 getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und eine Einzellzellsuspension bereitet. Jeweils $3x10^5$ Zellen wurden mit den gezeigten $OVA_{323-339}$ Konz. restimuliert. Zu sehen ist der Mittelwert einer Gruppe für die jeweilige Konzentration. **A** zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der Proliferationsversuche. **B** zeigt die Ergebnisse der IL-2 Bioassays zusammengefasst. In **C** und **D** sind nur die als tolerant eingestuften Mäuse zusammengefasst (C = Proliferation, D = IL-2). $OVA_{323-339}$ n= 11(8) aus 4 Experimenten, $OVA_{327-337}$ n= 7(4) aus 3 Experimenten, $OVA_{(327-338)327y,338a}$ n= 7 aus 2 Experimenten, $OVA_{(327-337)327y,336q}$ n= 7 aus 2 Experimenten, PBS n= 11 aus 5 Experimenten. In Klammern, Anzahl der auf IL 2 untersuchten Mäuse. Weiteres siehe auch Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6.

Zunächst musste beobachtet werden, dass es durch Injektion des Epitops OVA(327-337)327y,336q (yHAAHAEINqA) in BALB/c Mäusen nicht möglich war, für das WT-Epitop (OVA323-339) Toleranz zu induzieren. Auch der IL-2 Bioassay zeigte keine Reduzierung der IL-2 Sekretion. Die OVA(327-337)327y,336q behandelten Zellen verhielten sich bei der ex vivo durchgeführten Restimulation wie die Negativkontrollen (PBS i.v.). Im Vergleich hierzu zeigten

OVA(327-338)327y,338a (yHAAHAEINEAa) behandelte Mäuse eine den OVA323-339 und OVA327-337 behandelten Mäusen vergleichbares Verhalten. Sie zeigten eine deutlich reduzierte Proliferation und IL-2 Sekretion, wenn deren Lymphozyten ex vivo restimuliert wurden. OVA(327-338)327y,338a hatte sich gegenüber OVA(327-337)327y,336q bereits in den Proliferationsassays als stärkerer Aktivator gezeigt. OVA(327-338)327y,338a zeigt in der IL-2 Analyse (B) etwas schwächere Werte als die beiden original OVA-Epitope, in der Abbildung C und D zeigen alle toleranten Mäuse (ob original OVA-Epitope oder OVA(327-338)327y,338a behandelt) ein identisches Toleranzverhalten. Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6 zeigen unter der Rubrik Tag 17 die, entsprechend der gesetzten Toleranzkriterien, zusammengefassten Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche (wobei die Ergebnisse der mit OVA(327-337)327y,336q behandelten Mäuse aus oben genannten Gründen nicht gezeigt sind).

5.2.3 Beobachtung der induzierten Toleranz über die Zeit

In Hinblick auf den klinischen Einsatz Peptid basierender Toleranzinduktion bei Autoimmunkrankheiten ist es von Interesse, wie lange die induzierte Toleranz anhält. Es soll hier beobachtet werden, ob sich die Serumstabilität D-Aminosäuren-substituierter Peptide günstig auf die Dauer der induzierten Toleranz auswirkt. Analysiert wurde deshalb das Verhalten der Lymphozyten 40 und 60 Tage nach i.v. Injektion des entsprechenden Peptidepitops. Der Versuchablauf ähnelt den oben beschriebenen Experimenten, mit der Ausnahme, dass die Zeit zwischen intravenöser Peptidinjektion und subkutaner Immunisierung von 10 auf 33 bzw. 53 Tage verlängert wurde. Die Mäuse erhielten an Tag 33 bzw. Tag 53 die subkutane Immunisierung mit $OVA_{323-339}$ und wurden 7 Tage später (Tag 40 bzw. 60 nach Peptid i.v.) zur Analyse der Lymphozyten getötet.

5.2.3.1 Toleranz 40 Tage post i.v.

BALB/c-Mäuse erhielten an Tag 0 entweder $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$ oder $OVA_{(327-338)327y,338a}$ i.v.. Die Kontrollmäuse erhielten PBS alleine i.v.. An Tag 33 wurden alle Mäuse mit 100µg $OVA_{323-339}$ s.c. immunisiert. An Tag 40 wurden alle Mäuse getötet und die Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten in Kultur mit verschiedenen Konzentrationen $OVA_{323-339}$ restimuliert. Wiederum wurden die Proliferation und IL-2 Sekretion als Toleranzkriterien erfasst. Die Abbildung 5.4 zeigt die zusammengefassten Proliferations- bzw. IL-2-Ergebnisse aller Tag 40 Experimente, wobei sowohl tolerante wie auch nicht tolerante Mäuse derselben Gruppe zu einem Graphen zusammengefasst wurden. Zur Differenzierung in tolerante bzw. nicht tolerante Mäuse (entsprechend der gesetzten Toleranzkriterien) wurden in den Abbildungen C und D nur die toleranten Mäuse zusammengefasst dargestellt. In Tabelle 5.5 und

Tabelle 5.6 sind alle Mäuse nach tolerant/nicht tolerant aufgeschlüsselt. Alle Werte wurden nach dem bereits erläuterten Schema standardisiert und zusammengeführt.

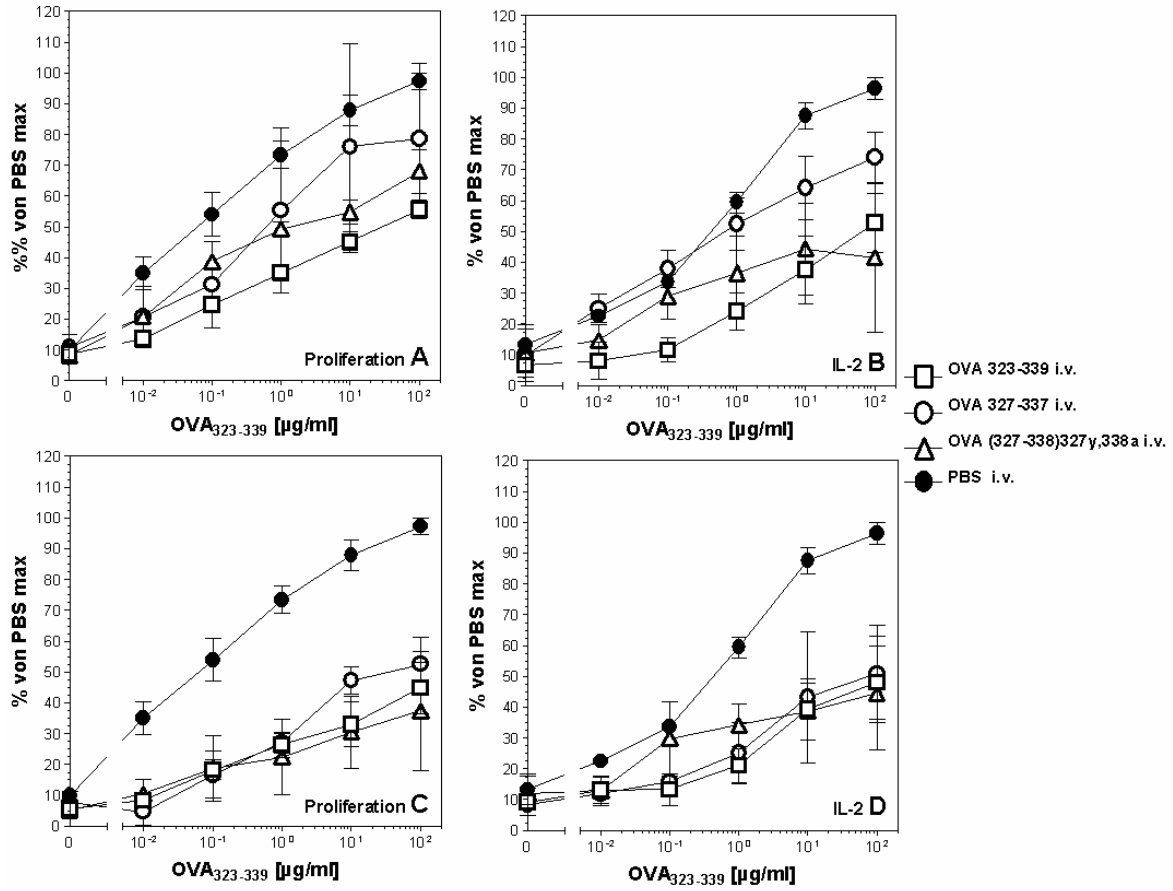

Abbildung 5.4: Zusammenfassung Tag 40

BALB/c Mäuse bekamen entweder 300µg $OVA_{(327-338)327y,338a}$, $OVA_{323-339}$ oder $OVA_{327-337}$ i.v.. Die Negativkontrollen erhielten PBS alleine. Alle Mäuse wurden an Tag 33 post i.v. mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA immunisiert und am Tag 40 getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und eine Einzellzellsuspension bereitet. Jeweils $3x10^5$ Zellen wurden mit den gezeigten $OVA_{323-339}$ Konz. restimuliert. Zu sehen ist der Mittelwert einer Gruppe für die jeweilige Konzentration. **A** zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der Proliferationsversuche. **B** zeigt die Ergebnisse der IL-2 Bioassays zusammengefasst. In **C** und **D** sind nur die als tolerant eingestuften Mäuse zusammengefasst (C = Proliferation, D = IL-2). $OVA_{323-339}$ n= 13(12) aus 5 Experimenten, $OVA_{327-337}$ n= 8(7) aus 3 Experimenten, $OVA_{(327-338)327y,338a}$ n= 9 aus 2 Experimenten, PBS n= 11 aus 5 Experimenten. In Klammern, Anzahl der auf IL 2 untersuchten Mäuse. Weiteres siehe auch Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6.

Aus der Abbildung 5.4 wird ersichtlich, dass die Toleranz nach Injektion von 300µg $OVA_{323-339}$ oder $OVA_{(327-338)327y,338a}$ am Tage 40 nach Injektion noch nachweisbar war. Die Lymphozyten der $OVA_{327-337}$ behandelten Mäuse erzielten weniger deutliche Ergebnisse. Entspre-

chend der Toleranzkriterien gelang es hier nicht sicher, mittels $OVA_{327-337}$ anhaltende Toleranz zu induzieren, wobei durchaus einige Mäuse ein tolerantes Verhalten zeigten. Das Peptid $OVA_{(327-338)327y,338a}$ erbrachte bei nur zwei D-Aminsäuren-Substitutionen in die Originalsequenz eine deutliche Überlegenheit gegenüber $OVA_{327-337}$. Diese Überlegenheit war dabei deutlicher in den IL-2 Analysen. Bezüglich der Qualität der induzierten Toleranz zeigten alle eingesetzten Peptide ein vergleichbares Verhalten (Abbildung C und D).
Aus Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6 lässt sich die Quote toleranter zu nicht toleranten Mäusen entnehmen.

5.2.3.2 Toleranz 60 Tage post i.v.

BALB/c-Mäuse erhielten an Tag 0 entweder $OVA_{323-339}$ oder $OVA_{(327-338)327y,338a}$, die Negativkontrollen erhielten PBS alleine i.v.. An Tag 53 wurden alle Mäuse mit 100µg $OVA_{323-339}$ s.c. immunisiert. An Tag 60 wurden alle Mäuse getötet und die Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten in Kultur mit verschiedenen Konzentrationen $OVA_{323-339}$ restimuliert. Wiederum wurden die Proliferation und die IL-2 Sekretion als Toleranzkriterien erfasst.
Die Abbildung 5.5 zeigt die zusammengefassten Proliferations- bzw. IL-2- Ergebnisse aller Tag 60 Experimente. Alle Werte wurden nach dem bereits erläuterten Schema standardisiert und zusammengeführt. OVA wurde entsprechend der Tag-40-Ergebnissen nicht weiter mitgeführt.

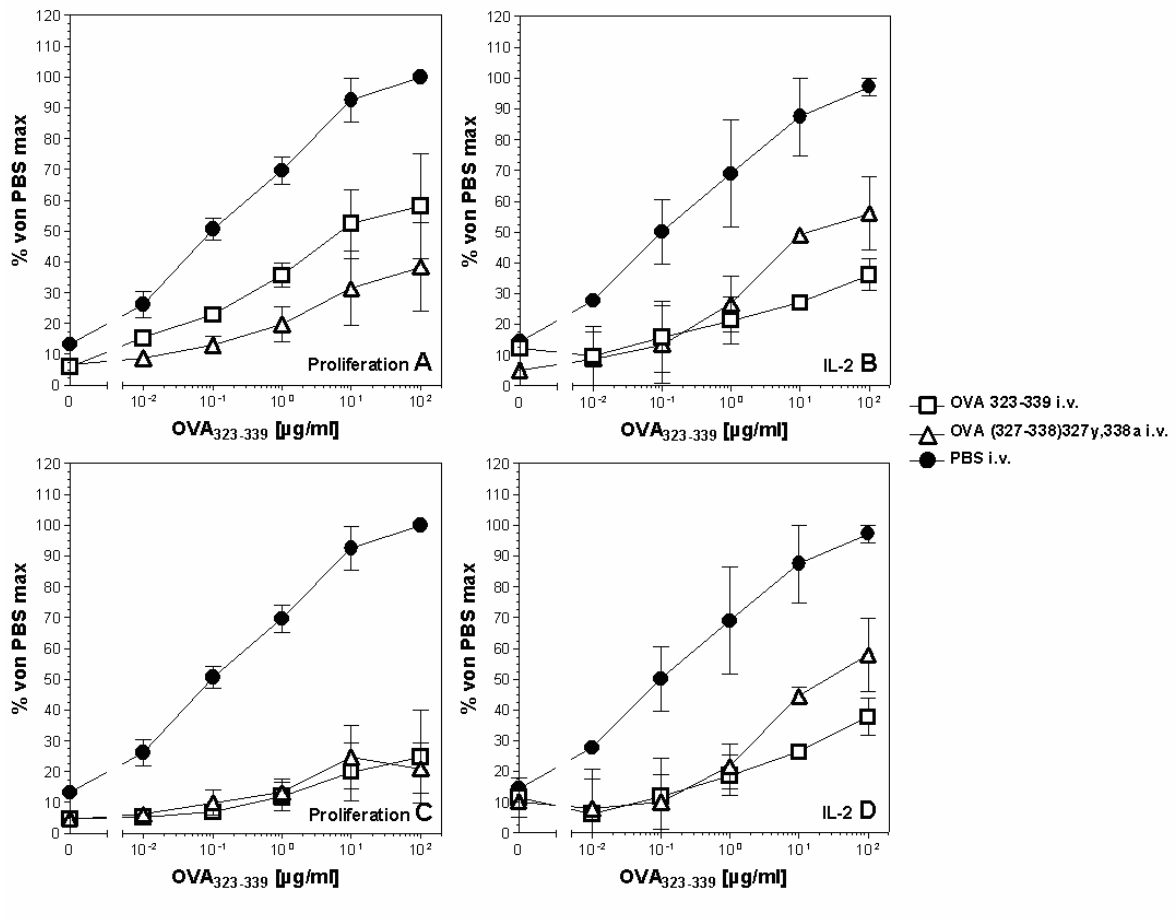

Abbildung 5.5 **Zusammenfassung der Tag 60 Versuche**

BALB/c bekamen entweder 300µg $OVA_{(327-338)327y,338a}$ oder 300µg $OVA_{323-339}$ i.v.. Die Negativkontrollen erhielten PBS alleine. Alle Mäuse wurden an Tag 53 post i.v. mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA immunisiert und am Tag 60 getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und eine Einzellzellsuspension bereitet. Jeweils $3x10^5$ Zellen wurden mit den gezeigten $OVA_{323-339}$ Konz. restimuliert. Zu sehen ist der Mittelwert einer Gruppe für die jeweilige Konzentration. **A** zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der Proliferationsversuche. **B** zeigt die Ergebnisse der IL-2 Bioassays zusammengefasst. In **C** und **D** sind nur die als tolerant eingestuften Mäuse zusammengefasst (C = Proliferation, D = IL-2). $OVA_{323-339}$ n= 6 (5) aus 2 Experimenten $OVA_{(327-338)327y,338a}$ n= 9 aus 2 Experimenten PBS n= 6 aus 2 Experimenten. In Klammern, Anzahl der auf IL 2 untersuchten Mäuse. Weiteres siehe auch Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6.

Entsprechend der Abbildung 5.5 war die durch i.v.-Injektion von $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ induzierte Toleranz auch noch an Tag 60 nach Injektion deutlich vorhanden. Die Lymphozyten der mit Peptid behandelten Mäuse benötigten über 100x mehr Peptid zur Restimulation, um die halbmaximalen Werte der Negativkontrollen zu erreichen, und waren damit entsprechend der Toleranzkriterien sicher tolerant. Ein vermeintlicher Vorteil von $OVA_{(327-338)327y,338a}$ gegenüber $OVA_{323-339}$ in der Proliferationsanalyse relativierte sich in den IL-2

Analysen.

Während in den oben gezeigten Grafiken alle Mäuse (d.h. sowohl tolerante als auch nicht tolerante (A + B) oder nur tolerante Mäuse (C + D)) zu der entsprechenden Peptidgruppe zusammengefasst wurden, sollen die unten gezeigten Tabellen Aufschluss darüber geben, wie viele Mäuse in der jeweiligen Peptidgruppe als tolerant bzw. nicht tolerant eingestuft wurden. Tabelle 5.5 zeigt diese Ergebnisse für Tag 17, 40 und 60 bezüglich der Proliferationsassays zusammengefasst. Tabelle 5.6 zeigt die Ergebnisse an Tag 17, 40 und 60 für die IL-2 Bioassays zusammengefasst. Aus den Tabellen lässt sich entnehmen, dass $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ vergleichbar dauerhafte Toleranz erzeugten, ebenso scheinen beide vergleichbar zuverlässig Toleranz zu induzieren. Die Quote toleranter zu nicht toleranten Mäusen lag bei beiden um etwa 70-80%. Zusammengefasst zeigten diese beiden Epitope eine über die Zeit stabile und dauerhafte Toleranzinduktion.

Tabelle 5.5: **Dauerhaftigkeit der induzierten Toleranz im Überblick, Proliferation.** Gezeigt sind die bezüglich Proliferation gemäß den gesetzten Toleranzkriterien als tolerant eingestuften Mäuse. Vor der Klammer ist die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse, in Klammern die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Peptid behandelten Mäuse angegeben. Die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse setzt sich wie folgt zusammen: Von der Gesamtzahl wurden all diejenigen Mäuse abgezogen, die nach den Toleranzkriterien als nicht tolerant anzusehen sind. Zusätzlich wurde der tolerante Anteil in Prozent angegeben.

Peptidepitop i.v.		$OVA_{323-339}$		$OVA_{327-337}$		$OVA_{(327-338)\ 327y,338a}$	
	AS-Sequenz	**ISQAVHAAHAEINEAGR**		**VHAAHAEINEA**		**yHAAHAEINEAa**	
		Tolerant	%	Tolerant	%	Tolerant	%
Tag 17		9 (11)	**82%**	5 (7)	**71%**	5 (7)	**71%**
Tag 40		9 (13)	**69%**	5 (8)	**63%**	6 (8)	**75%**
Tag 60		4 (6)	**67%**	2 (3)	**67%**	7 (9)	**78%**

Tabelle 5.6: **Dauerhaftigkeit der induzierten Toleranz im Überblick, IL-2 Sekretion.** Gezeigt sind die bezüglich IL-2 Sekretion gemäß den gesetzten Toleranzkriterien als tolerant eingestuften Mäuse. Vor der Klammer ist die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse, in Klammern die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Peptid behandelten Mäuse angegeben. Die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse setzt sich wie folgt zusammen: Von der Gesamtzahl wurden all diejenigen Mäuse abgezogen, die nach den Toleranzkriterien als nicht tolerant anzusehen sind. Zusätzlich wurde der tolerante Anteil in Prozent angegeben. (n.u. = nicht untersucht)

Peptidepitop i.v.		$OVA_{323-339}$		$OVA_{327-337}$		$OVA_{(327-338)\ 327y,338a}$	
	AS-Sequenz	**ISQAVHAAHAEINEAGR**		**VHAAHAEINEA**		**yHAAHAEINEAa**	
		Tolerant	%	Tolerant	%	Tolerant	%
Tag 17		7 (8)	**88%**	3 (4)	**75%**	4 (7)	**57%**
Tag 40		8 (12)	**67%**	3 (7)	**43%**	6 (8)	**75%**
Tag 60		4 (5)	**80%**	n.u.	n.u.	8 (9)	**89%**

5.2.4 Beobachtung der induzierten Toleranz bei Dosisreduktion

In Hinblick auf eine mögliche Einsparung an Peptid im Falle eines therapeutischen Einsatzes, z.B. in der Behandlung autoimmuner Erkrankungen, wollten wir versuchen, die Peptide in

niedrigeren Dosierung einzusetzen, um ggf. Vorteile der serumstabilisierten Peptide zu erarbeiten.

Um zu testen, ob eine verlängerte Serumhalbwertszeit eine Dosisreduktion der eingesetzten Peptide erlaubt, wurde die Peptiddosis auf 100µg/Maus reduziert.

Die Versuche wurden ansonsten nach demselben Protokoll wie oben durchgeführt: Die Mäuse erhielten an Tag 0 eine Injektion von 100µg Peptid/Maus i.v., die Kontrollen erhielten indes PBS alleine. An Tag 10 bekamen alle Mäuse eine s.c. Immunisierung mit 100µg $OVA_{323-339}$. Nach weiteren 7 Tagen wurden alle Mäuse getötet und die drainierenden Lymphknoten entnommen und *in vitro* restimuliert. Abbildung 5.6 zeigt $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ bei Dosisreduktion im direkten Vergleich.

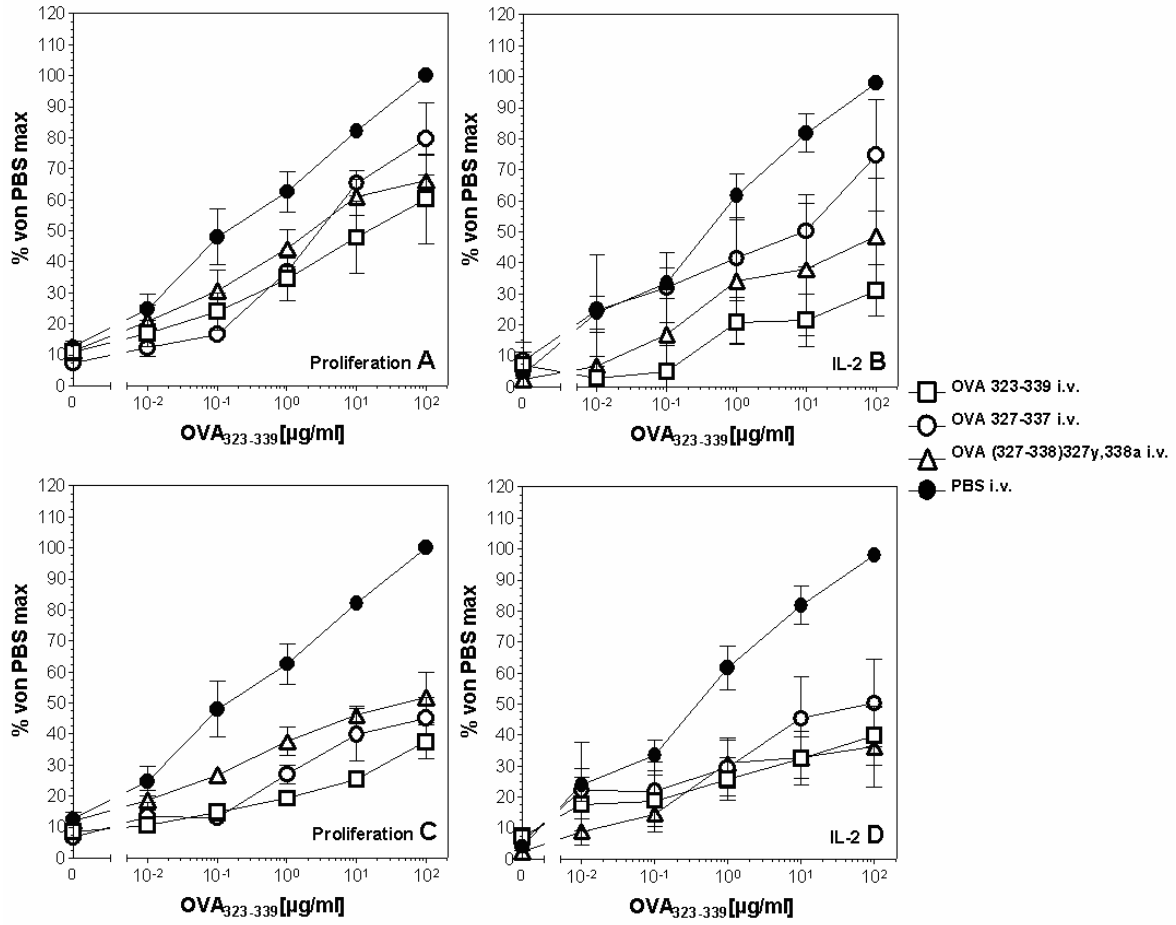

Abbildung 5.6 **Dosisreduktion im Vergleich, Zusammenfassung der Proliferation.**
BALB/c bekamen entweder oder 100µg $OVA_{323-339}$, 100µg $OVA_{327-337}$ oder 100µg $OVA_{(327-338)327y,338a}$, i.v.. Die Negativkontrollen erhielten PBS alleine. Alle Mäuse wurden an Tag 10 post i.v. mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA immunisiert und am Tag 17 getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und eine Einzellzellsuspension bereitet. Jeweils $3x10^5$ Zellen wurden mit den gezeigten $OVA_{323-339}$ Konz. restimuliert. Zu sehen ist der Mittelwert einer Gruppe für die jeweilige Konzentration. **A** zeigt die zusammengefassten Ergebnisse der

Proliferationsversuche. **B** zeigt die Ergebnisse der IL-2 Bioassays zusammengefasst. In **C** und **D** sind nur die als tolerant eingestuften Mäuse zusammengefasst (C = Proliferation, D = IL-2). ($OVA_{323-339}$ n= 13(12) aus 5 Experimenten, $OVA_{(327-338)327y,338a}$ n= 18 aus 4 Experimenten, $OVA_{327-337}$ n= 10(9) aus 3 Experimenten, PBS n= 11 aus 5 Experimenten). In Klammern, Anzahl der auf IL 2 untersuchten Mäuse. Weiteres siehe Tabelle 5.7 und. Tabelle 5.8.

Die „Versagerquote“ war in der Gruppe der $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Mäuse bezüglich der Proliferationsergebnisse etwas erhöht. Die Abbildung C suggeriert auch ein etwas schlechteres Abschneiden gegenüber $OVA_{323-339}$. Die Gruppe der $OVA_{323-339}$ behandelten Mäuse benötigten deutlich mehr Peptid in der Restimulation, um eine vergleichbare Proliferation zu erreichen. Bezüglich der IL-2 Daten relativierte sich dieser Sachverhalt, hier verhielten sich beide Gruppen gleich (Siehe Abbildung D). Tabelle 5.7 stellt die durchgeführten Toleranzexperimente bei Dosisreduktion zusammen und vergleicht die Proliferationsdaten bezüglich der aufgestellten Toleranzkriterien. Tabelle 5.8 vergleicht die IL-2 Daten derselben Experimente.

Tabelle 5.7: **Toleranzinduktion bei Dosisreduktion, Proliferation**.
Gezeigt sind die bezüglich Proliferation gemäß den gesetzten Toleranzkriterien als tolerant eingestuften Mäuse. Vor der Klammer ist die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse, in Klammern die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Peptid behandelten Mäuse angegeben. Die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse setzt sich wie folgt zusammen: Von der Gesamtzahl wurden all diejenigen Mäuse abgezogen, die nach den Toleranzkriterien als nicht tolerant anzusehen sind. Zusätzlich wurde der tolerante Anteil in Prozent angegeben.

Peptidepitop i.v.		$OVA_{323-339}$		$OVA_{327-337}$		$OVA_{(327-338)327y,338a}$	
	AS-Sequenz	**ISQAVHAAHAEINEAGR**		**VHAAHAEINEA**		**yHAAHAEINEAa**	
		Tolerant	von Total	Tolerant	von Total	Tolerant	von Total
300µg i.v.		9 (11)	**82%**	5 (7)	**71%**	5 (7)	**71%**
100µg i.v.		10 (13)	**77%**	7 (10)	**70%**	11 (18)	**61%**

Tabelle 5.8: **Toleranzinduktion bei Dosisreduktion, IL-2 Sekretion.**
Gezeigt sind die bezüglich IL-2 Sekretion gemäß den gesetzten Toleranzkriterien als tolerant eingestuften Mäuse. Vor der Klammer ist die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse, in Klammern die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Peptid behandelten Mäuse angegeben. Die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse setzt sich wie folgt zusammen: Von der Gesamtzahl wurden all diejenigen Mäuse abgezogen, die nach den Toleranzkriterien als nicht tolerant anzusehen sind. Zusätzlich wurde der tolerante Anteil in Prozent angegeben.

Peptidepitop i.v.		$OVA_{323-339}$		$OVA_{327-337}$		$OVA_{(327-338)\ 327y,338a}$	
	AS-Sequenz	**ISQAVHAAHAEINEAGR**		**VHAAHAEINEA**		**yHAAHAEINEAa**	
		Tolerant	von Total	Tolerant	von Total	Tolerant	von Total
300µg i.v.		7 (8)	**88%**	3 (4)	**75%**	4 (7)	**57%**
100µg i.v.		11 (12)	**92%**	7 (9)	**78%**	15 (18)	**83%**

5.2.5 Visualisierung der Toleranzinduktion

5.2.5.1 Erläuterung zur Adoptiv-Transfer-Methode

Durch eine Veränderung des Versuchsablaufs ist es möglich, die OVA-spezifischen T-Lymphozyten in BALB/c-Mäusen *in vivo* zu studieren. Bisher konnte keine Aussage über die Art der induzierten Toleranz gemacht werden. Um beobachten zu können, auf welche Art und

Weise die eingesetzten Epitope periphere Toleranz induzieren, wurde ein adoptives Transfer Modell gewählt (siehe auch 4.1.3 und 4.3.3). In diesem System wurden Lymphozyten transgener DO11.10-Mäuse bzw. DO11.10 X BALB/c-Mäuse in gewöhnliche BALB/c Mäuse transferiert. Die OVA transgenen T-Zellen der DO11.10-Mäuse lassen sich zu beliebigen Zeitpunkten durch den klonotypisch monoklonalen Antikörper (MAk) KJ 26.1 (Fluoreszenz-) markieren und mittels FACS-Analyse in den untersuchten Geweben *ex vivo* nachweisen.
Die T-Zellen der DO11.10 Mäuse exprimieren den α/β-T-Zellrezeptor (TZR) des T-Zellklons DO11.10. Dieser ist für $OVA_{323-339}$/I-A^d des Ovalbumins-Proteins spezifisch. Die Anzahl der betreffenden $OVA_{323-339}$ spezifischen T-Zellen ist in diesen Mäusen gegenüber anderen Mäusen (z.B. BALB/c) massiv erhöht, ohne dass diese T-Zellen jemals Kontakt mit $OVA_{323-339}$ hatten.
Der KJ 26.1 Antikörper erkennt hoch spezifisch den OVA (bzw. DO11.10)-T-Zellrezeptor der transgenen DO11.10 Lymphozyten. Obwohl die DNA dieser Mäuse ein (gen)technisch eingesetztes Gen für T-Zellrezeptor-Vα und T-Zellrezeptor-Vβ besitzen, welche den DO11.10 α/β-T-Zellrezeptor codieren, sind nur zwischen 50% und 80% aller $CD4^+$ T-Zellen dieser Mäuse durch den spezifischen AK KJ 26.1 detektierbar. Es existieren in diesen Mäusen auch $CD4^+$ T-Zellen welche die transgene β-Kette mit einer endogenen, nicht transgenen α-Kette kombinieren. Diese $CD4^+$ T-Zellen sind dann KJ 26.1 negativ, bzw. lassen sich nicht durch diesen AK detektieren und machen die restlichen 20-50% der $CD4^+$ T-Zellen aus. DO11.10 T-Zellen sind in BALB/c Mäusen nur in geringer Anzahl vorhanden bzw. nicht detektierbar. Selbst nach Immunisierung mit $OVA_{323-339}$ in CFA s.c. lassen sich DO11.10 tragende T-Zellen mit Hilfe des Fluoreszenz gekoppelten KJ 26.1 nicht ohne weiteres detektieren (Versuche nicht gezeigt).

5.2.5.2 Beispielhafte FACS-Analysen

Die Abbildung 5.7: zeigt Ergebnisse exemplarischer FACS-Analysen. Sie sollen dem Betrachter einen Einblick in die Auswertung der durchgeführten FACS-Analysen geben. Alle Analysen zeigen die Färbung (Markierung) mit Anti CD4-PE (Ordinate) gegen KJ1.26-FITC (Abszisse). Aus den entnommenen Lymphknoten oder Milzen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Zellen mit den genannten Antikörpern und Propidiumiodid (PI) inkubiert. Alle gezeigten Zellen entstammen dem Lymphozyten-Gate. Mit PI angefärbte (tote) Zellen wurden ausgeblendet (ausgegatet). Folgende Zellpopulationen lassen sich mit Hilfe der durchgeführten Färbung beobachten und wurden in den Abbildungen durch ein Kreuz in Quadranten aufgeteilt: Es befinden sich oben links die $CD4^+$ und $KJ1.26^-$ (negativen) Zellen, oben rechts die $CD4^+$ und

KJ1.26$^+$ doppelt positiven Zellen. In der Regel wurden 5x10^5 CD4$^+$ Zellen analysiert, nicht CD4$^+$ markierte Zellen wurden weitestgehend ausgeblendet. Aus der Population CD4$^+$ Zellen wurde die Anzahl der CD4$^+$ und KJ1.26$^+$ doppelt positiven Zellen berechnet und als prozentualer Anteil der CD4$^+$ Zellen bestimmt. Das Verhältnis wird im entsprechenden Quadranten als Prozentwert angegeben.

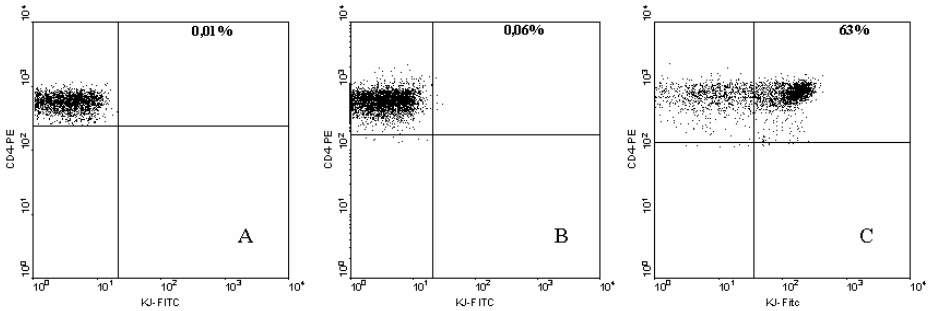

Abbildung 5.7: Exemplarische FACS-Analysen Vergleich BALB/c- vs. DO11.10 Maus
A) Eine BALB/c-Maus (ca. 6 Wochen alt) wurde getötet und aus den Lymphknoten eine Einzelzellsuspension bereitet. Diese wurde gefärbt (mit AK inkubiert) und analysiert. Die Frequenz von 0,01% CD4$^+$ und KJ- 26.1$^+$ doppelt positiven Zellen ist vernachlässigbar klein. Dieser Versuch wurde mit denselben Ergebnissen wiederholt, Einzellfärbungen (nicht gezeigt) bestätigen diese Ergebnisse. **B**)Eine BALB/c-Maus (ca. 6 Wochen alt) wurde mit 100 µg $OVA_{323-339}$ in CFA s.c. immunisiert. 6 Tage später wurde die Maus getötet und die drainierenden Lymphknoten entnommen. Eine Einzelzellsuspension wurde bereitet, gefärbt und analysiert. Trotz Immunisierung zeigt auch diese Maus eine vernachlässigbare Frequenz von 0,06% CD4$^+$ und KJ- 26.1$^+$ doppelt positiven Zellen. Würden diese Zellen *in vitro* mit $OVA_{323-339}$ restimuliert, so würden diese im Vergleich zu naiven (nicht immunisierten) Zellen aber eine deutlich stärkere Proliferation zeigen. Dieses Verhalten zeigt an, dass diese Mäuse eigene, spezifische, nicht durch den KJ 26.1 detektierbare T-Zellrezeptor exprimieren. Dieser Versuch wurde mit denselben Ergebnissen wiederholt, Einzellfärbungen (nicht gezeigt) bestätigen diese Ergebnisse. **C**)Eine DO11.10-Maus (ca. 6 Wochen alt) wurde getötet und aus der Milz eine Einzelzellsuspension bereitet. Diese wurde gefärbt und analysiert. In allen hier dargestellten Abbildungen zeigen nur CD4$^+$ Zellen, CD4$^-$ Zellen sind ausgeblendet. Die Doppelfärbungen wurden durch Einzellfärbungen kontrolliert (Versuche nicht gezeigt).

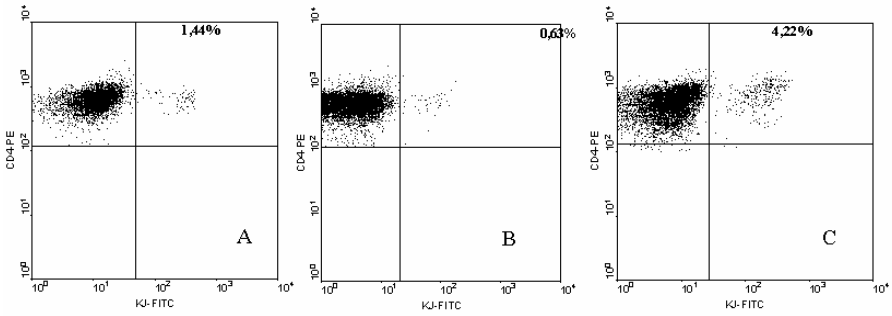

Abbildung 5.8: Exemplarische FACS-Analysen bei adoptivem Transfer

Die gezeigten BALB/c-Mäuse erhielten an Tag 0 $2x10^7$ Milzzellen einer DO11.10-Maus gleichen Geschlechts und Alters (ca. 6 Wochen). **A**) An Tag 3 wurde diese Maus getötet und aus den Lymphknoten eine Einzelzellsuspension bereitet. Diese wurde gefärbt und analysiert. **B**) An Tag 10 wurde diese Maus getötet und aus den Lymphknoten eine Einzelzellsuspension bereitet. Diese wurde gefärbt und analysiert. **C**) An Tag 10 wurde diese Maus mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA s.c. immunisiert. An Tag 17 wurde die Maus getötet und aus den drainierenden Lymphknoten eine Einzelzellsuspension bereitet. Diese wurde gefärbt und analysiert. Die Abbildungen zeigen nur $CD4^+$ Zellen, $CD4^-$ Zellen sind ausgeblendet. Die Doppelfärbungen wurden durch Einzellfärbungen kontrolliert (Versuche nicht gezeigt).

5.2.6 Toleranzinduktion im Adoptiv-Transfer-System

Wie in 4.1.3 beschrieben, wurde ein adoptiver Transfer durchgeführt. Den Mäusen wurde drei Tage nach adoptivem Transfer von $3x10^7$ DO11.10-Maus-Milzzellen das gezeigte Peptidepitop bzw. PBS (Negativkontrollen) i.v. injiziert. 11 Tage danach bekamen alle Mäuse $OVA_{323-339}$ s.c. in CFA als Immunisierung. Wiederum eine Woche später wurden die Mäuse getötet und deren Lymphknotenzellen mit $OVA_{323-339}$ restimuliert. Abbildung 5.9: zeigt die zusammengefassten Daten der adoptiven Transferexperimente. Zusätzlich zu den Proliferations- und IL-2-Daten wurde die mittlere Frequenz an DO11.10 Zellen in den entnommenen Lymphknoten per FACS bestimmt und für jede Peptidgruppe zusammengefasst, gemittelt und in Prozent angegeben.

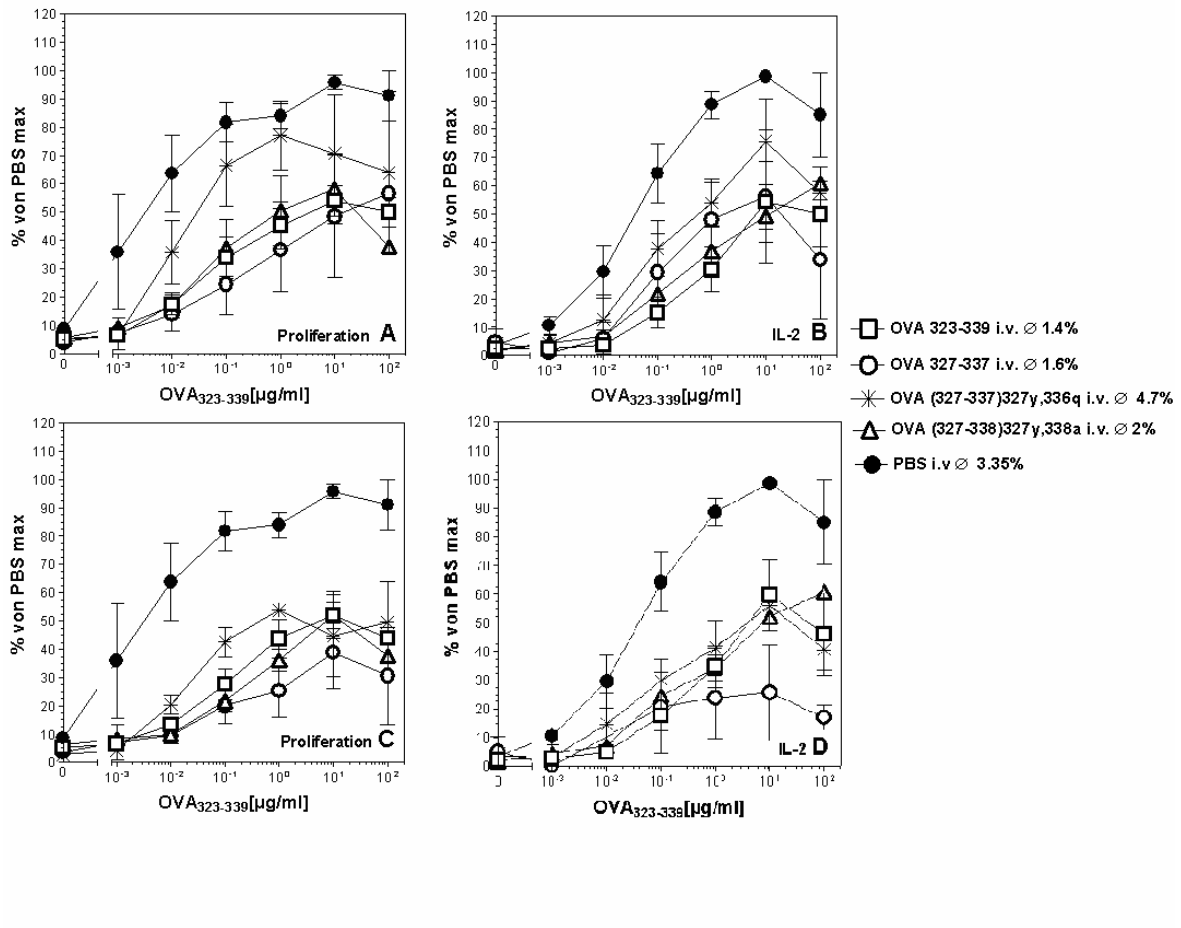

Abbildung 5.9: Zusammenfassung Transferexperimente

Am Tag 3 nach dem Transfer erhielten die Mäuse 300µg Peptid, die Negativkontrollen PBS alleine i.v.. Alle Mäuse wurden an Tag 10 post Peptid i.v. mit 100µg $OVA_{323-339}$ in CFA s.c. immunisiert und am Tag 17 getötet. Die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen und eine Einzelzellsuspension bereitet. Jeweils $3x10^5$ Lymphknotenzellen pro Maus wurden mit den gezeigten $OVA_{323-339}$ Konz. restimuliert. Zu sehen sind die zusammengefassten Daten aus allen Transferexperimenten für die jeweilige Peptidgruppe. Mittels FACS-Analyse wurde in jedem Experiment die Frequenz an DO11.10 Zellen in den entnommenen Lymphknoten für die jeweilige Peptidgruppe bestimmt (gemittelt). Die Frequenz wurde als prozentualer Anteil der DO11.10 Zellen an der Gesamtzellzahl der in Kultur genommenen Zellen angegeben. Die Frequenzen an DO11.10 Zellen wurden ebenfalls je Gruppe gemittelt und sind in der Legende angegeben. **A** zeigt die zusammengefassten Proliferationsergebnisse. **B** zeigt die Zusammenfassung der IL-2 Bioassays der Versuche aus **A**. CTLL2 Zellen wurden dafür mit den Überständen aus **A** stimuliert. In **C** und **D** sind nur die als tolerant eingestuften Mäuse zusammengefasst (C = Proliferation, D = IL-2). $OVA_{323-339}$ n= 9 aus 4 Experimenten, $OVA_{327-337}$ n= 7(6) aus 3 Experimenten, $OVA_{(327-337)327y,336q}$ n= 7(6) aus 3 Experimenten, $OVA_{(327-338)327y,338a}$ n= 10 aus 3 Experimenten, PBS n= 12 aus 4 Experimenten. In Klammern, Anzahl der auf IL 2 untersuchten Mäuse. Weiteres siehe Tabelle 5.9.

Aus der Abbildung 5.9: lässt sich entnehmen, dass die Lymphozyten der mit Peptid behandelten Mäuse bei Restimulation eine deutlich reduzierte Proliferation und IL-2 Sekretion zeigten.

Entsprechend der gesetzten Toleranzkriterien wurden die Peptid behandelten Mäuse somit als tolerant eingestuft. So benötigten diese Zellen in der Restimulation mind. 50x mehr Peptid, um die halbmaximale Proliferation der Negativkontrollen (PBS) zu erreichen. Eine Ausnahme bildeten wie auch in den nicht Transferexperimenten die mit $OVA_{(327-337)327y,336q}$ behandelten Lymphozyten. Bezüglich der Proliferation erreichten diese Zellen nicht das Toleranzkriterium. Sie benötigten nur etwa 10x mehr Peptid, um die halbmaximale Proliferation der Negativkontrollen zu erreichen. Gemessen an der IL-2 Sekretion zeigte sich dennoch eine deutlich reduzierte IL-2 Sekretion. Die Zellen benötigten hier über 60x mehr Peptid, um die halbmaximalen Werte der Negativkontrollen zu erreichen. Entsprechend der gesetzten Toleranzkriterien waren diese Mäuse zumindest hier tolerant. Zusammengefasst wurde die deutlichste Toleranz bei Injektion von $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ erreicht. Zellen dieser Mäuse benötigten deutlich mehr Peptid, um die halbmaximalen Werte der Negativkontrollen zu erreichen (sowohl in den Proliferations- als auch in den IL-2 Analysen). Die Abbildungen C und D suggerieren eine Überlegenheit von $OVA_{327-337}$ gegenüber den anderen Peptiden, wobei die Quote toleranter zu nicht toleranten Mäusen klar für die Gruppen $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelter Mäuse spricht. Die Tabelle 5.9 zeigt die Ergebnisse der Transfer-Experimente zusammengefasst.

Tabelle 5.9: **Zusammenfassung der Transfer-Experimente**
Gezeigt sind die bezüglich Proliferation und IL-2 Sekretion gemäß den gesetzten Toleranzkriterien als tolerant eingestuften Mäuse. Vor der Klammer ist die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse, in Klammern die Gesamtzahl der mit dem entsprechenden Peptid behandelten Mäuse angegeben. Die Anzahl der als tolerant eingestuften Mäuse setzt sich wie folgt zusammen: Von der Gesamtzahl wurden all diejenigen Mäuse abgezogen, die nach den Toleranzkriterien als nicht tolerant anzusehen sind Zusätzlich wurde der tolerante Anteil in Prozent angegeben.

Peptidepitop i.v.		**$OVA_{323-339}$**		**$OVA_{327-337}$**		**$OVA_{(327-338)\ 327y,338a}$**		**$OVA_{(327-337)\ 327y,336q}$**	
	AS-Sequenz	**ISQAVHAAHAEINEAGR**		**VHAAHAEINEA**		**yHAAHAEINEAa**		**yHAAHAEINqA**	
		Tolerant	von Total	Tolerant	von Total	Tolerant	von Total	Tolerant	von Total
Proliferation		7(9)	**78%**	5(7)	**71%**	8 (10)	**80%**	4 (7)	**57%**
IL-2 Sekretion		8 (9)	**89%**	4(6)	**67%**	9 (10)	**90%**	3 (6)	**50%**

Bei der Betrachtung der Daten aus den vorausgegangenen Ergebnissen fiel auf, dass die Frequenz an DO11.10 zwischen den einzelnen Peptidgruppen deutlich und reproduzierbar differierte.

Wegen der schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Peptidgruppen untereinander aufgrund unterschiedlich hohen Anteils an DO11.10 Zellen, wurden die Proliferations- und IL-2- Daten auf die Frequenz an DO11.10 Zellen bezogen und normiert. Hierzu wurde der erreichte Proliferationswert (als % von PBS max) durch die in den Legenden der Abbildung 5.9: (A u. B)angegebene Frequenz an DO11.10 Zellen dividiert und damit auf die Frequenz an

DO11.10 Zellen normiert. Die Abbildung 5.10: zeigt die normierten Daten bezüglich der Proliferation und der IL-2 Sekreti-
on.

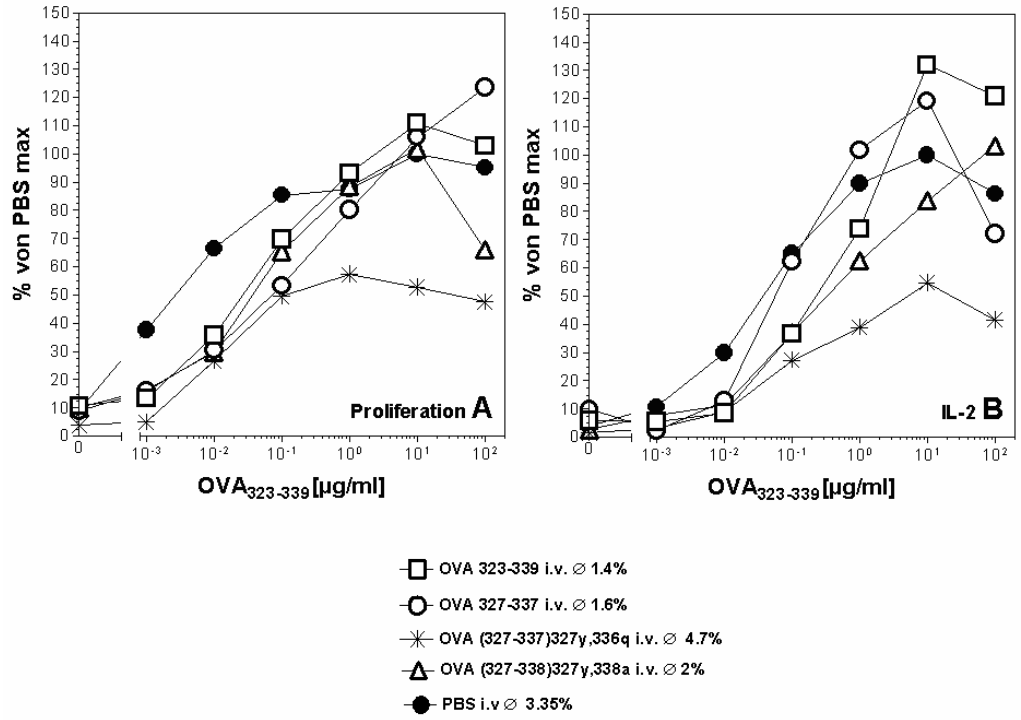

Abbildung 5.10: Frequenz normierte Zusammenfassung der adoptiv-Transfer-Experimente
Zu sehen sind die Daten aus Abbildung 5.9:. **A** und **B**, welche durch die Frequenz an DO11.10 Zellen der jeweiligen Gruppen dividiert (normiert) wurden. **A** zeigt die normierten Daten der Proliferation, **B** die normierten IL-2 Daten. Eine Normierung der Daten aus Abbildung 5.9: C und D wurde nicht durchgeführt, da die Frequenzen an DO11.10 Zellen aus für das jeweilige Peptid gepoolten Zellsuspensionen stammte (darin tolerante und nicht tolerante Mäuse).

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Abbildung 5.10:, zeigt sich ein anderes Bild. Bezogen auf den Gehalt an DO11.10 Zellen muss festgestellt werden, dass die Zellen der mit $OVA_{(327-337)327y,336q}$ behandelten Mäuse die geringste Proliferation und IL-2 Sekretion pro DO11.10 Zelle zeigen. Gemäß der Abbildung 5.9: (A und B) erreichten diese Zellen nicht die halbmaximale Proliferation oder IL-2 Sekretion der Negativkontrollen. Eine Normierung der Daten aus Abbildung 5.9: C und D wurde nicht durchgeführt, da die Frequenzen an DO11.10 Zellen aus für das jeweilige Peptid gepoolten Zellsuspensionen stammte (darin tolerante und nicht tolerante Mäuse). Im Kontrast hierzu verhielten sich die Zellen der $OVA_{327-337}$ und $OVA_{323-339}$

behandelten Mäuse. Die Zellen dieser Mäuse übertrafen die Negativkontrolle bei Restimulation im Bereich hoher Peptidkonzentration um über 20%. Mit anderen Worten zeigte sich hier eine höhere Proliferationsbereitschaft und IL-2 Sekretion pro DO11.10 Zelle verglichen mit den Zellen unbehandelter Mäuse. Dieses Verhalten zeigte sich deutlicher im Bereich hoher restimulativer Peptiddosen und war deutlicher bezüglich der IL-2 Sekretion, weniger deutlich bezüglich Proliferation. Die Zellen der mit $OVA_{(327\text{-}338)327y,338a}$ verhielten sich ähnlich denen der mit den original OVA-Epitopen behandelten Mäuse, wobei nur bei maximaler Stimulation die Negativkontrollen überboten wurden. In der Normierung der IL-2 Analysen zeigen $OVA_{(327\text{-}338)327y,338a}$ behandelte Mäuse etwas bessere Ergebnisse als die mit $OVA_{327\text{-}337}$ und $OVA_{323\text{-}339}$ behandelten Mäuse.

6 Diskussion

6.1 Der DO11.10 T-Zellrezeptor erkennt auch verkürzte OVA-Varianten

In der vorliegenden Arbeit wurde die extrathymische, antigenspezifische Toleranzinduktion mittels Injektion von alterierten, stabilisierten Peptidepitopen untersucht. In einer Verkürzungsanalyse wurde zunächst die $OVA_{323-339}$ Sequenz auf ein Minimum an Aminosäuren (AS) verkürzt und die Wirkung auf DO11.10-T-Zellen untersucht, welche den transgenen, spezifischen T-Zellrezeptor (TZR) für OVA $_{323-339}$ tragen und dieses Peptid im I-A^d-Kontext erkennen. Die antigene Potenz der entstandenen Peptide wurde dabei in Form von Proliferation der DO11.10 Zellen *in vitro* gemessen. In der Verkürzungsanalyse konnte $OVA_{323-339}$, ein 17 AS langes Peptid, auf OVA $_{327-337}$, ein 11 AS langes Peptid, verkürzt werden.
Gemessen an der stimulatorischen Potenz des Ausgangspeptides OVA $_{323-339}$, erreichte das Peptid OVA $_{327-337}$ die halbmaximale Proliferation bei einer ca. 20fach höheren Peptidkonzentration. Die Verkürzung auf 9 AS (OVA $_{328-336}$) ging mit einem beträchtlichen Verlust an stimulatorischer Potenz einher (ca. 150fach, siehe auch Tabelle 5.4). Vermutlich wurden hier für die Erkennung durch und die Aktivierung von DO11.10 Zellen wichtige AS entfernt. Entsprechend den Ergebnissen aus den Verkürzungsanalysen fehlt diesem Peptid das Valin in der Position 327 des OVAlbumins. Offensichtlich handelt es sich hier um eine so genannte Ankerposition des Peptides im Peptid/I-A^d-Komplex. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Scott (1998, [115]) bei der Analyse der OVA/I-A^d Bindung. Hier liegt das Valin der Position 327 in der I-A^d-Tasche Nummer 4 und scheint somit dem Peptid/I-A^d –Komplex eine besondere Stabilität zu verleihen. Beeson et al. konnten 1999 [116] zeigen, dass die Position 327 sogar wahlweise in der Tasche 1 oder 4 des Peptid/I-A^d –Komplexes liegen konnte, was diese Position im Sinne des Wortes, doppelt wichtig für die Antigenpräsentation macht. Die hier durchgeführten Substitutionsanalysen zeigten im Widerspruch dazu, dass es offensichtlich unerheblich war, welche Aminosäure in dieser Position stand. In die Position 327 konnte hier jede D-Aminosäure ohne Stimulationsrückgang substituiert werden. Dies zeigt, dass offensichtlich diese Position zwar besetzt sein muss, die Peptid/ I-A^d Bindung aber auch von der Nachbarschaft (weitere Aminosäuresequenz, z.B. Besetzung der weiteren Taschen) abhängt. Bei näherer Betrachtung der zweiten Substitutionsanalyse fiel dann auf, dass, sobald die Position 327 durch ein rechtsdrehendes Tyrosin (**y**) besetzt war, keine weiteren Substitutionen (außer Glycin) in der Position 330 erlaubt waren. In der ersten Substitutionsanalyse waren noch ca. 9 weitere Substitutionen in der Position 330 akzeptiert worden. Beeson zeigte, dass, wenn die Position 327 in der ersten Peptid/ I-A^d –Tasche

lag, die Position 330 in der vierten Tasche liegen musste. Diese Beobachtung erklärt vermutlich die oben beschriebenen Ergebnisse aus der zweiten Substitutionsanalyse.
Entsprechend der Verkürzungsanalysen (siehe Tabelle 5.1) zeigten sich dann neben der Position 327 auch die Positionen 328 sowie 336 und 337 als wichtige Positionen. Diese hier gemachte Beobachtung entspricht exakt den Ergebnissen von Evavold et al. (2000, [117]). Weiterhin kamen die beiden oben genanten Autoren auch zu dem Schluss, dass ein und dasselbe Peptid verschieden im I-A^d-Kontext präsentiert werden kann. Evavold konnte durch die Verwendung von DO11.10 RAG-defizienten ($RAG^{-/-}$) Mäusen zusätzlich beweisen, dass die gesehene Proliferation von DO11.10-Zellen nicht durch die endogene Rekombination einer oder beider T-Zell-Rezeptorketten verursacht wurde. Das ist für die hier präsentierte Arbeit insofern bedeutsam, als dass die hier eingesetzten DO11.10 Mäuse der Rekombination eigener T-Zellrezeptoren fähig waren ($RAG^{+/+}$).

6.2 D-Aminosäuren-substituierte Peptide werden vom DO11.10 T-Zellrezeptor erkannt

Basierend auf dem 11mer $OVA_{327-337}$ wurden dessen AS durch rechtsdrehende Aminosäuren (D-AS) ausgetauscht. In diesen Substitutionsanalysen wurde jede einzelne Position in $OVA_{327-337}$ durch jede mögliche rechtsdrehende Aminosäure ersetzt und die jeweils entstandenen Peptide DO11.10 Zellen als Stimulans angeboten. Es zeigte sich, dass der Einbau von D-AS durch den T-Zellrezeptor je nach Position und substituierter Aminosäure toleriert wurde und dass DO11.10 Zellen mit den einzelnen Peptidvarianten zur Proliferation und IL-2 Sekretion angeregt werden konnten. Das Peptid $OVA_{(327-338)327y,338a}$.(yHAAHAEINEAa) erwies sich letztlich als besonders starker Agonist am DO11.10 T-Zellrezeptor mit einer dem $OVA_{323-339}$ vergleichbaren stimulatorischen Potenz. *In vitro* zeigten die aktivierten T-Zellen ein Th1-typisches Zytokinsekretionsmuster mit hoher IL-2 und INF γ Produktion. Dagegen produzierten diese Zellen nur wenig IL-4.
Bei den hier durchgeführten Substitutionsanalysen ist bemerkenswert, dass offensichtlich erneut einige der Positionen von besonderer Bedeutung für die Erkennung durch den DO11.10 T-Zellrezeptor sind. So zeigte der Austausch der Aminosäuren in den Positionen 331, 333 und 335 durch Glycin (kein Stereoisomer möglich) nur in diesen Positionen einen deutlichen Rückgang der Proliferation von DO11.10 Zellen. Diese simpelste aller Aminosäuren konnte ansonsten in alle anderen Positionen ohne Stimulationsrückgang eingesetzt werde. Da es hier aber primär um das Einbringen von rechtsdrehenden Aminosäuren ging, wurde diese Begebenheit nicht weiter untersucht. Eine sehr ähnliche Beobachtung machten allerdings Evavold et al. (2000 [117]), als sie in jede einzelne Position von $OVA_{323-339}$ ein Alanin (bzw. Serin) einsetzten. Peptide, welche

in den Positionen 331, 333 und 335 ein Alanin substituiert bekommen hatten, zeigten einen deutlichen Proliferationsrückgang, wenn DO11.10 Zellen mit diesen inkubiert wurden. Evavold schloss daraus, dass diese Positionen (zumindest Position 333 und 335) wichtig für die Erkennung durch den T-Zellrezeptor sind, da sie, entsprechend der cristallographischen Untersuchungen über den OVA/I-A^d-Komplex, außerhalb einer I-A^d-Tasche liegen und somit nicht maßgeblich für die OVA/I-A^d-Bindung von Bedeutung sind. Die Beobachtung, dass sich OT-II Zellen (weiterer $OVA_{323-339}$ spezifischer Klon) bezüglich der oben geschilderten Substitutionsanalysen ähnlich verhielt, unterstützt diese Hypothese.
Anhand der erhobenen Proliferation schloss Evavold, dass unter den drei genannten Positionen die Position 333 am wichtigsten ist, und der durch DO11.10 Zellen erkannte Peptidteil an dieser Position beginnt, da in der Position 331 wesentlich mehr Substitution von DO11.10 Zellen akzeptiert wurden. Diese Daten konnten wir hier ebenfalls bestätigen, mit dem Unterschied, dass hier D-Aminosäuren substituiert wurden (Auswertung nicht gezeigt).
Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit über 1000 verschieden Peptide mit DO11.10 T-Zellen inkubiert, wobei ausschließlich nach agonistisch wirkenden Epitopen gesucht wurde. Im Überblick der durchgeführten Verkürzungsanalysen sowie Substitutionsanalysen konnte eine Vielzahl von Epitopen bestimmt werden, welche eine agonistische Wirkung am DO11.10 T-Zellrezeptor entfalteten. In den gezeigten Analysen lässt sich die volle Bandbreite von schwacher bis starker Stimulation beobachten, wenn, wie hier geschehen, Proliferation (ggf. auch IL-2 Produktion) als Maßstab gewählt werden. Diese Beobachtung bestätigt und erweitert Beschreibungen von Evavold (1991-1995, [111, 112, 118, 119]) und Wucherpfennig (1995, [120]), welche belegen, dass eine Diversität an Peptiden durch ein und denselben T-Zellrezeptor erkannt werden. Entsprechend der „molecular mimikry“-Hypothese (Alvord et al. 1985 [79] , Oldstone et al. 1985 [80]) kann diese Diversität auch im Rahmen von autoimmunen Erkrankungen eine Rolle spielen. Weiterhin wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass je nach Ligand auch ein Antagonismus sowie ein so genannter partieller Agonismus am betreffenden T-Zellrezeptor möglich ist (Evavold siehe oben, Übersicht in Kersh 1996 [121]). Es muss davon ausgegangen werden, dass unter den hier gescreenten Peptiden und D-Peptiden auch Antagonisten und partielle Agonisten waren. Der Einsatz solcher Peptide in der Toleranzinduktion bei autoimmunen Erkrankungen erscheint deshalb ebenso interessant wie der Einsatz des originalen (natürlichen) Antigens. Es ist denkbar, dass die Blockierung des T-Zellrezeptor autoreaktiver T-Zellen durch Antagonisten zumindest einen kurzfristigen Rückgang der Krankheitsaktivität bei bestehender autoimmuner Erkrankung herbeiführen könnte. In weiteren Arbeiten könnten Vor- bzw. Nachteile dieser Peptide *in vitro* wie *in vivo* geklärt werden, wobei Experimente in Mäusen

bezüglich der experimentellen Multiplen Sklerose (MS) bereits Erfolge zeigten (Franco 1994 [122]). Die Umsetzung dieser Art von Therapie in Patienten mit MS zeigte in einer Phase II Studie die iatrogene (therapieinduzierte) Exazerbation der Erkrankung in einigen mit Antagonisten behandelten Patienten und ist offensichtlich nicht ohne Weiteres vom Mausmodell auf den Menschen übertragbar (Bielekova 2000 [5], Zusammenstellung in Kamradt 2001 [6]).

6.3 D-Aminosäuren-substituierte Peptide weisen eine deutlich verlängerte *in vitro* Serumhalbwertszeit auf

Die Analyse der *in vitro* Serumhalbwertszeit mittels HPLC erbrachte für die D-Aminosäuren-substituierten Peptide eine deutlich verlängerte *in vitro* Serumhalbwertszeit. Mausserum wurde mit den verschiedenen Peptiden inkubiert. Die in bestimmten Zeitintervallen entnommenen Proben wurden auf den verbleibenden Gehalt an Peptid untersucht und mit dem Gehalt zum Zeitpunkt 0 verglichen. Die Analyse der verschiedenen Peptide erbrachte eine deutliche Verlängerung der Serumhalbwertszeit bereits nach Einbau einer einzigen rechtsdrehenden Aminosäure. So zeigte yHAAHAEINEA ($OVA_{(327-337)327y}$) verglichen mit VHAAHAEINEA ($OVA_{327-337}$) eine ca. 10fach verlängerte *in vitro* Serumhalbwertszeit. Offensichtlich spielt für die Serumstabilität auch die Position im Peptid eine Rolle; so zeigte VHmAHAEINEA mit einer HWZ von unter 2h eine deutlich kürzere HWZ als yHAAHAEINEA mit ca. 5,5 Stunden. Peptide mit endständig positionierten D-Aminosäuren erbrachten eine höhere Serumstabilität als Peptide mit mittig stehenden D-Aminosäuren. Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein 12mer hergestellt, der die Schlüsselposition in 337 (A, Alanin) behielt, aber N-Terminal durch ein y (D-Thyrosin) und C-Terminal durch ein a (D-Alanin) flankiert ist (yHAAHAEINEAa = $OVA_{(327-338)327y,338a}$). Dieses Peptid zeigte die längste *in vitro* Serumhalbwertszeit und die stärkste stimulatorische Potenz an DO11.10 Zellen aller getesteten Peptide. Dieses Peptid erschien uns als bester Kandidat, um dessen Wirkung mit der Wirkung der Originalpeptide $OVA_{323-339}$ und der verkürzten Version $OVA_{327-337}$ zu vergleichen. Alle drei Peptide zeigten in vitro eine vergleichbare stimulatorische Potenz an DO11.10 Zellen und führten bezüglich des Zytokinsekretionsmusters zu keinem Wechsel von Th 1 zu Th 2, unterschieden sich also hauptsächlich in ihrer Serumhalbwertszeit. Das Peptid mit der Sequenz yHAAHAEINqA ($OVA_{(327-337)327y,336q}$) wurde ebenfalls aufgrund seiner Serumhalbwertszeit von ca. 12h für die *in vivo* Versuche ausgewählt, zeigt aber eine deutlich reduzierte stimulatorische Potenz an DO11.10 Zellen in den *in vitro* Versuchen und erschien uns deshalb als nur bedingt vergleichbar.
Der Versuch, die *in vivo* Peptidkonzentration nach intravenöser Injektion von Peptid, durch direkte Messung der Peptidkonzentration im Serum der Mäuse zu bestimmen, gelang nicht.

BALB/c Mäuse bekamen eine Injektion mit 0,3mg bzw. 0,6mg Peptid (jeweils $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-337)327y,336q}$ im Vergleich) in 300µl PBS i.v.. In dem nach ½ Stunde bzw. nach 4 Stunden entnommenen Serum dieser Mäuse konnte mittels HPLC kein Peptid bestimmt werden. Weiterhin wurde in folgenden Versuchen Mäusen post injectionem von 0,3mg bzw. 0,6mg Peptid i.v. die Milzen entnommen und diese nach Bercovici (1999, [123]) als Antigen präsentierende Zellen für zuvor mit MACS sortierte DO11.10 $CD4^+$- T-Zellen aus DO11.10-Mäusen eingesetzt. Die *in vivo* mit Peptid beladenen APC vermochten es zu keinem Entnahmezeitpunkt (0,5h, 2h, 4h u.a.), die $CD4^+$ Zellen signifikant zur Proliferation zu stimulieren (Versuche nicht gezeigt). Berovici und seine Mitarbeiter benutzen in ihren Versuchen ein anderes System mit Mäusen, welche für das Influenza-Virus Haemaglutinin-Peptid transgen waren. Die injizierte Peptiddosis war mit 0.75 mg unwesentlich höher als in dieser Arbeit. Die einfachste Erklärung für unsere Beobachtung wäre, dass die Antigen präsentierenden Zellen nicht in der Lage waren, aktivierende Signale zu geben, weil sie sich bereits im Stadium der Toleranz befanden.
Aufgrund der oben angeführten Ergebnisse stützen sich die hier besprochenen Daten nur auf die *in vitro* Messung der Serumhalbwertszeit, wobei noch folgendes beachtet werden sollte: Bezüglich eines Vergleiches der eingesetzten OVA-Varianten ist zu diskutieren, dass zum Beispiel die für $OVA_{323-339}$ angegebene *in vitro* Serumhalbwertszeit von unter zwei Stunden eventuelle, als Antigen wirksame „Metaboliten“, nicht berücksichtigt. Diese möglicherweise ebenfalls „wirksamen“ Abbauprodukte sind mit der HPLC-Methode nicht sicher zu identifizieren. Unter dem Aspekt, dass vorrangig endständige Aminosäuren als erste abgespalten werden, sind durchaus alle in den hier durchgeführten Verkürzungsanalysen gesehenen Peptide als Metaboliten möglich. Selbst das hier synthetisierte Peptid $OVA_{327-337}$ ($OVA_{327-337}$) könnte prinzipiell unter den Abbauprodukten von $OVA_{323-339}$ sein. Aufgrund dieser Überlegung ist der Vergleich von $OVA_{323-339}$ zu den D-Aminosäuren-substituierten 11meren nur bedingt verwertbar. Diesbezüglich erscheint eigentlich nur der Vergleich von $OVA_{327-337}$ zu seinen D-Aminosäuren-substituierten Varianten ein ebenbürtiger Vergleich zu sein. Die weitere Verkürzung von $OVA_{327-337}$ hatte einen drastischen Potenzrückgang zur Folge, so dass die hier entstehenden Metaboliten vernachlässigt werden können. Unklar ist, ob die von Scott (1998, [115]) sowie von Mc Farland (1999 [116]) beschriebenen alternativen Peptid/I-A^d-Bindungen hier auch eine Rolle spielen können. Bei zunehmender Entfernung von Aminosäuren aus den OVA-Peptiden werden auch die wichtigen Ankerpositionen für die Peptid/I-A^d-Bindungen entfernt und dieser Komplex zunehmend instabil. Entsprechend den Ergebnissen der oben genannten Arbeiten, bietet das $OVA_{323-339}$-Peptid aufgrund seiner Länge ggf. mehr alternative Bindungsmöglichkeiten als ein stark verkürztes Epitop, wobei hier nichts über die T-Zellerkennung ausgesagt werden kann.

6.4 D-Aminosäure substituierte OVA –Varianten induzieren periphere Toleranz

In zwei verschiedenen Maus-Modellen wurde in der vorliegenden Arbeit periphere Toleranz induziert. In beiden Fällen wurde Toleranz durch die intravenöse Injektion von löslichem und deaggregiertem D-Aminosäuren-substituiertem Peptid erzielt. In jedem durchgeführten Toleranzexperiment wurde eine Gruppe mitgeführt, welche kein Peptid erhielt und eine Gruppe, die das WT-Epitop $OVA_{323-339}$ erhielt. Der durch Injektion der verkürzten und D-Aminosäuren-substituierten Peptide erzielte Effekt konnte so mit dem „Ausgangswert" direkt verglichen werden. Zunächst wurden unmanipulierte BALB/c-Mäuse durch eine Injektion von D-Peptid i.v. behandelt, anschließend mit dem Ausgangspeptid ($OVA_{323-339}$) subkutan immunisiert. Die Lymphknotenzellen dieser Mäuse wurden eine Woche später *in vitro* mit $OVA_{323-339}$ restimuliert. Als Anhalt für die induzierte Toleranz diente die Messung der Proliferation und IL-2 Sekretion dieser Zellen. Mäuse, deren Zellen eine mindestens 50fach schwächere Proliferation oder IL-2 Sekretion als die Zellen der unbehandelten Mäuse zeigten, wurden als tolerant eingestuft.
Die folgenden Peptidepitope $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$, $OVA_{(327-337)327y}$ (yHAAHAEINEA), $OVA_{(327-337)327y,336q}$ (yHAAHAEINqA) und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ (yHAAHAEINEAa) wurden für die *in vivo* Versuche ausgewählt.
Sowohl durch die i.v. Injektion des verkürzten $OVA_{327-337}$ Peptidepitops, als auch durch D-Aminosäuren-substituierten $OVA_{327-337}$-Varianten konnte prinzipiell periphere Toleranz induziert werden. In der Regel lag die Quote toleranter Mäuse in den mit Peptid gespritzten Gruppen zwischen 60% und 90%. Reproduzierbare Werte über 90% wurden nur in der Gruppe der mit $OVA_{323-339}$ gespritzten Mäuse erreicht. Die Toleranz der Mäuse, welche $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ erhielten, erbrachte bei Injektion von 300µg Peptid/Maus nach 17 Tagen zum Teil etwas schwächere Ergebnisse. Wenn nun nur die als tolerant eingestuften Mäuse dargestellt wurden, zeigten sowohl die mit $OVA_{323-339}$ wie auch die mit $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Mäuse eine vergleichbar geringe Proliferation oder IL-2-Sekretion. Daraus ergibt sich, dass nicht die Qualität der Toleranzinduktion unterschiedlich war, sondern eher die Quantität (Quote) der Toleranzinduktionen zwischen den Peptiden differierte. Mit dem Epitop $OVA_{(327-337)327y,336q}$ ließ sich entsprechend der aufgestellten Toleranzkriterien durch Injektion von 300µg/Maus keine Toleranz induzieren. Die Zellen dieser Mäuse zeigten keine reduzierte Proliferation oder IL-2 Sekretion. Das Verhalten dieser Zellen entsprach damit dem Verhalten von Zellen nicht behandelter BALB/c Mäuse.
Eindeutige und konstante Ergebnisse hinsichtlich einer Toleranzinduktion in der Gruppe der alterierten Peptidepitope konnte durch Injektion von $OVA_{(327-338)327y,338a}$ erreicht werden. Die Zellen dieser Mäuse zeigten ein tolerantes Verhalten, welches den Zellen der mit OVA_{323-}

$_{339}$ gespritzten Mäuse am ähnlichsten war. Wenn nur die toleranten Mäuse untereinander verglichen wurden, zeigte sich insgesamt ein gleichwertiges Toleranzverhalten, wobei die „Versagerquote“ in der Gruppe der $OVA_{(327\text{-}338)327y,338a}$ behandelten Mäuse höher war.
In einem zweiten Modell nach Kearney und Jenkins (1994, [2]) wurden transgene DO11.10 Zellen in BALB/c Mäuse transferiert (engl. adoptive-transfer) und ihr Verhalten *in vivo* studiert. Mit Hilfe des klonotypischen Antikörpers KJ 1.26., welcher den T-Zellrezeptor der DO11.10 Zellen spezifisch erkennt, konnte die Frequenz dieser Zellen zu beliebigen Zeitpunkten nach Transfer in entnommenem Blut, der Milz oder den Lymphknoten festgestellt werden. Die Zellen der entnommenen Gewebe wurden dazu mit dem Fluoreszenz gekoppelten KJ 1.26 Antikörper inkubiert und anschließend einer FACS-Analyse zugeführt.
Die Mäuse wurden nach adoptivem Transfer wie die oben genannten Mäuse behandelt (Peptid-injektion und Immunisierung). Am Tag der Entnahme der Lymphknoten zur Kultivierung wurde die Frequenz der DO11.10 Zellen in der jeweiligen Gruppe festgestellt und später mit dem *in vitro* Verhalten (Proliferation und IL-2 Sekretion) bei Restimulation verglichen.
Mäuse, welche PBS alleine erhielten, zeigten nach s.c. Immunisierung eine hohe Frequenz an DO11.10 Zellen (3.4 %) in ihren Lymphknoten. Die Frequenz in den mit $OVA_{323\text{-}339}$, $OVA_{327\text{-}337}$ und $OVA_{(327\text{-}338)327y,338a}$ behandelten Mäusen erreichte nur etwa halb so hohe Werte (1.4 % bis 2 %). Die höchste Frequenz an DO11.10 Zellen zeigten die Lymphknoten der mit $OVA_{(327\text{-}337)327y,336q}$ behandelten Mäuse (im Schnitt 4.7 %).
Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wurden die Proliferations- und IL-2- Daten durch die Frequenz der enthaltenen DO11.10 Zellen geteilt und so die Werte auf den Gehalt an DO11.10 Zellen bezogen.
Es ergab sich hier folgendes Bild:

I. Lymphozyten der mit $OVA_{323\text{-}339}$ und $OVA_{327\text{-}337}$ behandelten Mäuse zeigten im Bereich hoher restimulativer Peptiddosen die ausgeprägteste Proliferationsbereitschaft und IL-2 Sekretion, wenn deren Verhalten auf die Frequenz der anwesenden DO11.10-Zellen bezogen wurde.

II. Die Lymphozyten der mit $OVA_{(327\text{-}338)327y,338a}$ gespritzten Mäuse lagen bezüglich der Proliferation nur knapp unter der PBS- Gruppe. Etwas deutlicher zeigte sich der Unterschied zur PBS-Gruppe in der IL-2 Sekretion.

III. Die mit $OVA_{(327\text{-}337)327y,336q}$ behandelten Lymphozyten zeigten eine geringere Proliferationsbereitschaft und IL-2 Sekretion pro DO11.10 Zelle als die Negativkontrollen und allen mit Peptid behandelten Mäusen.

Bezüglich der Wirkung von $OVA_{323-339}$ und $OVA_{327-337}$ kann also festgestellt werden, dass der Grund, welcher zu einer vordergründigen Proliferationsabnahme sowie IL-2-Sekretionsminderung führte, letztendlich der geringere Gehalt an DO11.10 Zellen gewesen sein muss. Bezieht man hier die Frequenz der DO11.10 Zellen mit ein, liegt nahe, dass der Hauptmechanismus der Toleranzinduktion vermutlich die Deletion im Sinne eines aktivierungsinduzierten Zelltodes war. Die nicht deletierten Zellen zeigten interessanterweise eine mit der PBS-Gruppe verglichen, erhöhte Proliferationsbereitschaft, zumindest in den Bereichen hoher restimulativer Peptidkonzentrationen. Eine andere Erklärung könnte sein, dass diese Zellen prinzipiell anerg sind, durch ein hohes Antigen Angebot aber wieder in einen Effektorzustand versetzt werden können (Konzentrationsabhängige Aktivierung). In diesem Fall wäre aber im Bereich niedriger restimulativer Peptidkonzentrationen ein deutlicherer Unterschied zu den Negativkontrollen zu erwarten gewesen. Die hier beschriebenen Ergebnisse gehen nicht mit den Ergebnisse von Jenkins et al. ([56], [2]) konform. Jenkins beobachtete sowohl eine Reduktion der Zellzahl nach Peptid i.v. insgesamt, als auch ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf Restimulation mit dem vorher i.v. applizierten Peptid. Auch im Bereich hoher Dosen zeigten die Zellen deutlich verminderte Proliferation und IL-2 Sekretion. Ein bemerkenswerter Unterschied im Versuchsaufbau war eine erst 7 tage später durchgeführte (s.c.-) Immunisierung der Mäuse (Tag 17 nach Peptid i.v.). Ggf. wurden durch die verlängerte Pause anerge Zellen weiter ausselektiert. Auch Falb (1996, [3]) warteten 14 Tage nach Peptid i.v. bis zur *ex vivo* Restimulation.
Betrachtet man das Verhalten der mit $OVA_{(327-338)327y,338a}$ gespritzten Mäuse, zeigen deren Zellen vordergründig ein tolerantes Verhalten. Bezogen auf die Frequenz der DO11.10 Zellen zeigten diese Zellen sowohl eine Reduktion an Zellfrequenz entsprechend einer Zellzahlreduzierung, als auch eine mit der PBS-Gruppe verglichen verminderte Proliferation sowie IL-2 Sekretion der noch vorhandenen Zellen, wobei die IL-2 Sekretion, auch im Vergleich zu den unsubstituierten Epitopen, etwas deutlicher eingeschränkt war als die Proliferation.
Die Lymphozyten der mit $OVA_{(327-337)327y,336q}$ behandelten Mäuse zeigten überraschenderweise nach der Normierung auf den DO11.10 Gehalt die deutlichste Reduktion der Proliferation und IL-2 Sekretion. Dieses Verhalten war entsprechend der Ergebnisse aus den nicht adoptiven Experimenten nicht vorhersehbar gewesen, sodass das Peptid zunächst als uninteressant angesehen wurde. Die erhöhte Frequenz der Zellen impliziert, dass (wenn überhaupt) eine weniger ausgeprägte Deletion stattgefunden haben muss, und das die verbleibenden Zellen sehr deutlich in ihrer Proliferation und IL-2 Sekretion gestört waren. Die Zellen zeigten also am deutlichsten das Verhalten anerger Zellen. Diese Beobachtung ist mit den Ergebnissen von Jenkins zum Teil konform, der dasselbe Verhalten bei *in vivo* Peptid behandelten Lymphozyten beschrieb (Jenkins

et al. ([56], [2]). Eine Reduktion der Zellzahl lag hier allerdings nicht vor. Mäuse die in der vorliegenden Arbeit mit $OVA_{(327-337)327y,336q}$ i.v. behandelt wurden zeigten an Tag 7 nach s.c. Immunisierung die höchste Zellfrequenz an DO11.10 Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Aus dem Verhalten der Lymphozyten der $OVA_{327-337}$, $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ gespritzten Mäuse kann geschlossen werden, dass die Injektion der genannten Peptide primär zu einer Zellzahlreduktion z.B. im Sinne eines aktivierungsinduzierten Zelltodes der DO11.10-Zellen in diesen Mäusen führte. Wang (1993, [124]) und Critchfield (1994, [125]) beobachteten ein ähnliches Verhalten der Zellen bei Konfrontation (bei wesentlich höheren Dosen) mit spezifischem Antigen. Diese Begebenheit wird umso deutlicher, wenn man das *in vivo* Verhalten der transferierten Zellen beobachtet, welche nach i.v. Injektion des entsprechenden Peptides zunächst in den Lymphknoten und der Milz der gespritzten Maus akkumulierten und proliferierten (Versuche nicht gezeigt, siehe auch Pape 1997, [102]).

Auffällig war weiterhin, dass die Lymphknotenzellen der mit Peptid behandelten Mäuse sowohl in den Transferexperimenten als auch in den Nicht-Transferexperimenten im Falle von Toleranz eine deutlichere Störung der IL-2 Sekretion zeigten. Die Proliferation war in der Regel weniger ausgeprägt eingeschränkt. Auch in anderen Systemen äußerte sich T-Zelltoleranz auf der Basis einer funktionellen Nichtreaktivität stärker in einer Reduzierung der IL-2-Sekretion als in einer verminderten Proliferationsfähigkeit (Müller 1989, [126]; Jenkins 1991, [127]; Falb 1996, [3]). Dies könnte zum Beispiel daran liegen, dass bei hyporesponsiven Zellen die Sekretion anderer (ebenfalls proliferativ wirkender) Zytokine nicht, oder weniger eingeschränkt ist und Zellwachstum trotz reduzierter IL-2 Sekretion stattfindet. Um dies zu überprüfen, könnte zusätzlich die Sekretion anderer Zytokine gemessen werden.

Bleibt die Frage, warum die Injektion von $OVA_{(327-337)327y,336q}$ in unbehandelte BALB/c Mäuse keinerlei Wirkung zeigte. Man vergleiche hierzu die Ergebnisse der Transferexperimente mit denen bei unbehandelten BALB/c Mäusen. Geht man nun davon aus, dass eine vergleichsweise verminderte Deletion der spezifischen Zellen stattgefunden hat, so ist die verstärkte Proliferation und IL-2 Sekretion ggf. nur Zeichen einer erhöhten Frequenz an spezifischen T-Zellen. Da in diesem System keine Aussage über den Mechanismus der induzierten Toleranz gemacht werden kann, ist es rein spekulativ anzunehmen, dass die vorhandenen Zellen trotz ihrer erhöhten Frequenz anerges Verhalten zeigten. Die Transferexperimente weisen allerdings in diese Richtung. Ferner ist nicht auszuschließen, dass eine Überlagerung durch endogene T-Zellen der BALB/c Maus stattfand. Eventuell generiert die BALB/c Maus verschiedene T-Zellklone, von denen einige Klone $OVA_{(327-337)327y,336q}$ andere $OVA_{323-339}$ erkennen. Überschneidungen in der Spezifität dieser Klone sind denkbar. Ggf. sollten diese Mäuse in

einem eigenständigen Experiment anstatt mit $OVA_{323-339}$ mit $OVA_{(327-337)327y,336q}$ immunisiert bzw. restimuliert werden, um diesen Sachverhalt zu klären.

6.5 Stabile Toleranzinduktion trotz Dosisreduktion

Um einen möglichen Vorteil der verlängerten *in vitro* Serumhalbwertszeit der D-Aminosäuren-substituierten Peptide gegenüber $OVA_{323-339}$ und $OVA_{327-337}$ zu testen, wurde die Dosis der Peptidinjektion von 300µg auf 100µg je BALB/c Maus herabgesetzt. Es hatte sich in vorhergehenden Versuchen gezeigt, dass das Unterschreiten dieser Dosis zu einem markanten Anstieg der Proliferation der mit $OVA_{323-339}$ injizierten (tolerisierten) BALB/c Mäuse geführt hatte (Versuche nicht gezeigt).

BALB/c Mäuse wurden an Tag 0 mit 100µg der entsprechenden Peptide in PBS (bzw. PBS alleine) i.v. injiziert und an Tag 10 mit $OVA_{323-339}$ s.c. immunisiert. Eine Woche später wurden die drainierenden Lymphknoten dieser Mäuse entnommen und *in vitro* mit $OVA_{323-339}$ restimuliert.

Auch hier zeigte die Mehrheit der Lymphozyten von Peptid injizierten Mäuse eine reduzierte Proliferation und eine deutlich reduzierte IL-2 Sekretion. Mäuse die $OVA_{(327-338)327y,338a}$ oder $OVA_{327-337}$ bekommen hatten, zeigten im Vergleich zu $OVA_{323-339}$ behandelten Mäusen eine weniger starke Reduktion der Proliferation bzw. IL-2 Sekretion. Die Quote toleranter zu nicht toleranten Mäusen, die mit $OVA_{327-337}$ behandelt wurden, war vergleichbar mit den $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Mäusen (siehe Tabelle 5.7 und Tabelle 5.8). Bei der Betrachtung der Grafiken, in denen nur die toleranten Mäuse dargestellt sind, zeigten die mit $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Mäusen für die Proliferationsergebnisse eher schlechtere Daten. So benötigten diese Mäuse hier 100fach weniger Peptid um eine den $OVA_{323-339}$ behandelten Mäusen vergleichbar starke Proliferation zu bieten. Bezüglich der IL-2 Sekretion bestanden keine Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

Die Injektion von 100µg $OVA_{(327-337)327y,336q}$ brachte keinen Unterschied zu den oben genannten Daten (gleiches Verhalten wie bei 300µg i.v., Versuche nicht gezeigt)

Interessanterweise zeigten die Proliferationsdaten für das jeweilige Peptid zwischen 100µg und 300µg keine nennenswerten Unterschiede. Beim Vergleich der IL-2 Daten zeigte sich allerdings ein geringer Vorteil der mit 100µg gespritzten Mäuse (zumindest für die Peptide $OVA_{323-339}$ und $OVA_{327-337}$).

Anhand der oben geschilderten Daten ließ sich kein sicherer Vorteil der D-Aminosäuren-substituierten Peptide gegenüber den L-Peptiden herausarbeiten. Der Vergleich der Daten bei 100µg Peptid i.v. und 300µg Peptid i.v. erscheint die reduzierte Dosis von 100µg immer noch zu

hoch, um einen deutlichen Unterschied zwischen den eingesetzten Peptiden darzulegen. Ggf. sollten Experimente mit Dosierungen von 75µg oder 50µg Peptid i.v. versucht werden.

6.6 Die induzierte Toleranz hält mindestens bis zu 60 Tage an

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Dauerhaftigkeit extrathymisch induzierter antigenspezifischer Hyporesponsivität in BALB/c Mäusen untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob die Dauer der induzierten Toleranz von dem injizierten Peptidantigen abhängig ist, bzw. ob ein Unterschied entsprechend der verlängerten Serumhalbwertszeit einiger Epitope festzustellen ist. In Hinblick auf den Einsatz von D-Aminosäuren-substituierten Peptiden in der Therapie autoimmuner Erkrankungen, war von Interesse, wie lange die induzierte Toleranz beobachtbar ist, und ob sich hier der Vorteil von D-Aminosäuren-vermittelter Serumstabilität bemerkbar macht.

BALB/c Mäuse wurden an Tag 0 mit 300µg der entsprechenden Peptide in PBS (bzw. PBS alleine) i.v. injiziert und an Tag 33 bzw. 53 mit $OVA_{323-339}$ s.c. immunisiert. Eine Woche später wurden die drainierenden Lymphknoten dieser Mäuse entnommen und *in vitro* mit $OVA_{323-339}$ restimuliert. Wie in den Tag 17 Experimenten (s.o.) wurde die Proliferation und IL-2 Sekretion gemessen. Hierbei richtete sich das Augenmerk vornehmlich auf den Vergleich von $OVA_{323-339}$ zu $OVA_{(327-338)327y,338a}$, da beide eine vergleichbar starke stimulatorische Potenz am DO11.10 T-Zellrezeptor zeigen.

Die Analysen der induzierten Toleranz zeigten innerhalb jeder Peptid-Gruppe für die Peptide $OVA_{323-339}$, $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ vergleichbar konstante Ergebnisse über die gesamte beobachtete Zeit. Im Vergleich der einzelnen Peptide untereinander zeigten $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ einen leichten Vorteil gegenüber $OVA_{327-337}$

Die Analysen an Tag 40 und Tag 60 ergaben keine nennenswerten Unterschiede bezüglich Proliferation oder IL-2 Sekretion zwischen $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$.

Zusammenfassend zeigten die Lymphozyten der mit $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Mäuse eine stabile Toleranz über die gesamte hier beobachtete Zeit, wobei die Quote der „Therapieversager“ mit der Zeit bei $OVA_{323-339}$ behandelten Mäusen eher früher zunahm. Bemerkenswerterweise nahm die Zahl der nicht toleranten Mäuse in der $OVA_{(327-338)327y,338a}$ behandelten Gruppe mit der Zeit eher ab.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse wäre es interessant, das Zeitintervall zwischen der i.v. Gabe und der s.c. Immunisierung weiter zu strecken, um einen kritischen Bereich zu finden, in dem die Wirkung einer einmaligen i.v. Gabe deutlicher nachlässt. Besonders hier sollten sich Vor- oder Nachteile der eingesetzten Peptide zeigen.

6.7 Weitere Überlegungen

Betrachtet man die Wirkung von $OVA_{(327-338)327y,338a}$ unter dem Aspekt der bisweilen deutlicheren Wirkung gegenüber $OVA_{327-337}$, sowie unter dem Aspekt aktiver Metabolite des $OVA_{323-339}$, so muss festgestellt werden, dass der Einsatz von $OVA_{(327-338)327y,338a}$ effektiver war als der von $OVA_{323-339}$ oder $OVA_{327-337}$. Hiermit bestätigt sich zumindest für das Peptidepitop $OVA_{(327-338)327y,338a}$ die Hypothese des Vorteils D-Aminosäuren-substituierter Peptide gegenüber reinen L-Peptiden in der Toleranzinduktion. Bedauerlicherweise konnte der Vorteil des D-Peptides in den Dosisreduktionsversuchen nicht deutlich herausgearbeitet werden. $OVA_{327-337}$ und $OVA_{(327-338)327y,338a}$ zeigten hier vergleichbare Ergebnisse, $OVA_{323-339}$ schnitt etwas besser ab.

Aufgrund fehlender Messmethoden für die *in vivo* Halbwertszeit des gegebenen Peptids (s.o.), kann nur vermutet werden, dass die gegebenen Peptide vergleichbar schnell metabolisiert und ausgeschieden wurden. Die *in vitro* beobachtete verlängerte Halbwertszeit der Peptide spiegelt somit eher eine reine serumabhängige Stabilität wieder. Vermutlich kommt es *in vivo* neben der Inaktivierung bzw. Verkürzung durch serumständige Proteasen und Peptidasen, evtl. schnell zu einer Ausscheidung der Peptide. In einem Experiment von Scheffold (Manuskript in Arbeit) wurden die Peptidepitope $OVA_{323-339}$ und $OVA_{(327-337)327y,336q}$ an fluoreszierende Farbstoffe (FITC) gebunden und Mäusen i.v. injiziert. Bereits beim nächsten Urinlassen verfärbte sich der Urin der Mäuse beider Gruppen deutlich sichtbar. Nicht geklärt ist bisher, ob die Mäuse den gesamten Peptid-Farbstoff Komplex ausschieden, oder ob der Farbstoff vom Peptid getrennt und dann alleine ausgeschieden wurde. Es ist durchaus möglich, dass die injizierten Peptide sofort ausgeschieden werden, der kurze Kontakt aber ausreicht, um die Mehrzahl der antigenspezifischen Zellen zu deletieren oder zu anergisieren. Im Falle einer schnellen Ausscheidung könnten ggf. wiederholte Injektionen der Peptide bessere Ergebnisse erbringen. Die Arbeit von Bercovici (1999, [123]) weist darauf hin, dass die ständige Anwesenheit des Antigens (hier wöchentliche Injektion des Antigens über 12 Wochen) die Qualität der induzierten Toleranz beeinflusst. Bercovici berichtet über die Selektion deletionsresistenter, funktionell hyporesponsiver Zellen. Der Versuch, über eine verlängerte *in vivo* Serumhalbwertszeit der Antigene eine quasi chronische Anwesenheit des Peptids herzustellen, konnte zumindest mit den hier durchgeführten Experimenten nicht sicher erreicht oder bewiesen werden.

Im Hinblick auf eine andauernde Anwesenheit von Antigen, könnten Peptide von Interesse sein, welche aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung (z.B. Verbindung von D-Peptid mit Fettsäure) im enterohepatischen Kreislauf (re-) zirkulieren. Da auch der Darm sowie die Leber Orte immunologischer Vorgänge sind, könnten im Falle einer Zirkulation der Peptide spezifische

T-Zellen wiederholt durch eine einzige Injektion erreicht werden.
Von Interesse wäre weiterhin die Induktion von T-Zelltoleranz mittels so genannten All-D-AS-Peptiden, welche komplett aus D-Aminosäuren bestehen. Diese Peptide erwiesen sich als extrem stabil gegenüber einem Abbau durch Peptidasen. Eine weitere interessante Variante wäre Toleranzinduktion durch die intraperitoneale Applikation der Peptide in inkomplettem Adjuvans. Hier könnte die Peptidstabilität und eine ggf. verlängerte intracorporale Anwesenheit ebenfalls von Vorteil sein und zu einer verstärkten und länger andauernder Toleranz führen. Einer schnellen (z.B. renalen) Ausscheidung könnte somit eine stetige Peptidfreisetzung entgegengesetzt werden.
Unumstritten ist der Einsatz von D-Peptiden in der Medizin nach wie vor interessant. So bietet die immunogene Applikation von D-Peptiden (z.B. in Form einer s.c. Injektion) sehr wohl Vorteile gegenüber den L-Peptiden. Aufgrund ihrer deutlich verbesserten Stabilität eignen sich diese zur Vakzination und können die Antikörperproduktion im Vergleich zu Kontrollen steigern (Benkirane 1996, [7]; Van Regenmortel 1998, [8]). In diesem Sinne werden heutzutage Versuche durchgeführt um den Einsatz von D-Peptiden Medizin weiter voranzutreiben.
Auch diese Arbeit erbrachte neue und interessante Fragestellungen bezüglich der Wirkung von D-Peptiden, welche in folgenden Arbeiten aufgegriffen werden und näher beleuchtet werden könnten.

Danksagung

7 Danksagung

Herrn Dr. Thomas Kamradt und Dr. Achim Kramer danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung.

Dank an Jane Grogan und Carmen Infante Duarte für die Einführung in die Methoden.

Besonderer Dank an Christian Meisel, Martin Baumgart und Jochen Lehmann für die wissenschaftlichen sowie freundschaftlichen Gespräche.

Für Hilfsbereitschaft, gute Musik und gute Stimmung im Labor danke ich Orissa Bender, Bert Meier, Michael Ahmadi und Marc Molinger.

Vielen Dank auch an Anette Hausschild und Manuela Ohde für die fürsorgliche Pflege der Mäuse. Danke an Tuula Geske und Heidi Hecker-Kia für die Herstellung der verwendeten Antikörper.

Für die freundliche Aufnahme und die großartige Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich recht herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts.

Größten Dank an meine Eltern Walter und Cristina für ihre Geduld, Gebete und dass sie immer an mich geglaubt haben. Meiner Schwester Isabel sowie Ines und Marion für ihre Geduld und Liebe.

Abkürzungsverzeichnis

8 Abkürzungsverzeichnis

αm	**a**nti-**m**urin
Ag	**A**nti**g**en
AK	**A**nti**k**örper
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl.: **a**ntigen-**p**resenting **c**ell)
bp	**B**asen**p**aar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: **b**ovine **s**erum **a**lbumin)
CD	Definierte Oberflächenantigene auf Immunzellen (engl.:**c**luster of **d**ifferentiation)
CFA	komplettes Freund's Adjuvans (engl.: **c**omplete **F**reund's **a**djuvans)
cm	Zentimeter (engl.:**c**enti**m**eter)
CPM	Gemessene ß-Strahlung in einer Minute (engl. **c**ounts **p**er **m**inute)
CTL	**C**ytolytische-**T**-**L**ymphozyten (engl. cytotoxic…)
DIG	**Dig**oxigenin
DNA	**D**esoxyribo**n**ukleins**ä**ure
DZ	**D**endritische **Z**elle
ELISA	Engl.: **e**nzyme **l**inked **i**mmuno**s**orbent **a**ssay
ER	**E**ndoplasmatisches **R**etikulum
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: **f**etal **c**alf **s**erum)
FITC	**F**luoresceini**s**o**t**hio**c**yanat
FL	**Fl**uoreszenz
g	Erdbeschleunigung
HGG	(engl.: **h**uman **g**amma **g**lobulin)
HWZ	**H**alb**w**erts**z**eit
h	Stunde(lat.: **h**ora)
IFN-γ	**I**nter**f**ero**n**-**γ**
Ig	**I**mmun**g**lobulin
IL	**I**nter**l**eukin
IUPAC	Engl. **I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**pplied **C**hemistry
i.p.	**i**ntra**p**eritoneal
i.v.	**i**ntra**v**enös
KM	**K**ultur**m**edium
MHC	Haupthistokompatibilitäts Komplex (engl.: **m**ajor **h**isto compatibility **c**omplex)
min	**Min**ute
NK	**N**atürliche **K**iller(zelle)
NMS	**N**ormales **M**äuse**s**erum
OVA	**Ova**lbumin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: **p**hosphate **b**uffered **s**aline)

PE	**P**hyco**e**rythrin
PFA	**P**ara**f**orm**a**ldehyd
PMA	**P**horbol**m**yristat**a**cetat
rpm	Umdrehungen/min (engl.: **r**ounds **p**er **m**inute)
RT	**R**aum**t**emperatur
SA	**S**trept**a**vidin
SD	Standardabweichung (engl.: **s**tandard **d**eviation)
SEM	Standardfehler (engl.: standard erreor of mean)
Th	**T**-**H**elferzelle
TMB	3,3',5,5'-**T**etra**m**ethyl**b**enzidindihydrochlorid
TZR	T-Zell-Rezeptor (engl.: **T c**ell **r**eceptor)
TNF	**T**umor **N**ekrose **F**aktor
Tris	**Tris** (hydroxymethyl) aminomethan
Ts	**T**-**S**uppressorzelle
U	(Enzym-) Einheit (engl.: **U**nit)
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: **w**eight per **v**olume)

Literaturverzeichnis

9 Literaturverzeichnis

[1] Kyburz, D.; Aichele, P.; Speiser, D. E.; Hengartner, H.; Zinkernagel, R. M. und Pircher, H. (1993): T cell immunity after a viral infection versus T cell tolerance induced by soluble viral peptides, Eur J Immunol (Band 23), Nr. 8, Seite 1956-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8344359

[2] Kearney, E. R.; Pape, K. A.; Loh, D. Y. und Jenkins, M. K. (1994): Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo, Immunity (Band 1), Nr. 4, Seite 327-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7889419

[3] Falb, D.; Briner, T. J.; Sunshine, G. H.; Bourque, C. R.; Luqman, M.; Gefter, M. L. und Kamradt, T. (1996): Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy, Eur J Immunol (Band 26), Nr. 1, Seite 130-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8566055

[4] Warren, K. G.; Catz, I. und Wucherpfennig, K. W. (1997): Tolerance induction to myelin basic protein by intravenous synthetic peptides containing epitope P85 VVHFFKNIVTP96 in chronic progressive multiple sclerosis, J Neurol Sci (Band 152), Nr. 1, Seite 31-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9395124

[5] Bielekova, B.; Goodwin, B.; Richert, N.; Cortese, I.; Kondo, T.; Afshar, G.; Gran, B.; Eaton, J.; Antel, J.; Frank, J. A.; McFarland, H. F. und Martin, R. (2000): Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand, Nat Med (Band 6), Nr. 10, Seite 1167-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11017150

[6] Kamradt, T. und Mitchison, N. A. (2001): Tolerance and autoimmunity, N Engl J Med (Band 344), Nr. 9, Seite 655-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11228281

[7] Benkirane, N.; Guichard, G.; Briand, J. P.; Muller, S.; Brown, F. und Van Regenmortel, M. H. (1996): Mimicry of viral epitopes with retro-inverso peptides of increased stability, Dev Biol Stand (Band 87), Seite 283-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8854029

[8] Van Regenmortel, M. H. und Muller, S. (1998): D-peptides as immunogens and diagnostic reagents, Curr Opin Biotechnol (Band 9), Nr. 4, Seite 377-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9720264

[9] Naquet, P.; Ellis, J.; Tibensky, D.; Kenshole, A.; Singh, B.; Hodges, R. und Delovitch, T. L. (1988): T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals, J Immunol (Band 140), Nr. 8, Seite 2569-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2451692

[10] Kitze, B.; Pette, M.; Rohrbach, E.; Stadt, D.; Kappos, L. und Wekerle, H. (1988): Myelin-specific T lymphocytes in multiple sclerosis patients and healthy individuals, J Neuroimmunol (Band 20), Nr. 2-3, Seite 237. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2461957

[11] Germain, R. N. (1994): MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation, Cell (Band 76), Nr. 2, Seite 287-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8293464

[12] Chambers, C. A. und Allison, J. P. (1999): Costimulatory regulation of T cell function, Curr Opin Cell Biol (Band 11), Nr. 2, Seite 203-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10209159

[13] Watts, T. H. und DeBenedette, M. A. (1999): T cell co-stimulatory molecules other than CD28, Curr Opin Immunol (Band 11), Nr. 3, Seite 286-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10375549

[14] Weiss, A. (1993): T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases, Cell (Band 73), Nr. 2, Seite 209-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8477442

[15] Fields, B. A. und Mariuzza, R. A. (1996): Structure and function of the T-cell receptor: insights from X-ray crystallography, Immunol Today (Band 17), Nr. 7, Seite 330-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8763819

[16] Crabtree, G. R. (1989): Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation, Science (Band 243), Nr. 4889, Seite 355-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2783497

[17] Weiss, A. und Littman, D. R. (1994): Signal transduction by lymphocyte antigen receptors, Cell (Band 76), Nr. 2, Seite 263-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8293463

[18] Mosmann, T. R.; Schumacher, J. H.; Street, N. F.; Budd, R.; O'Garra, A.; Fong, T. A.; Bond, M. W.; Moore, K. W.; Sher, A. und Fiorentino, D. F. (1991): Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells, Immunol Rev (Band 123), Seite 209-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1684780

[19] Mosmann, T. R. und Coffman, R. L. (1989): TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, Annu Rev Immunol (Band 7), Seite 145-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2523712

[20] Bottomly, K. (1988): A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes, Immunol Today (Band 9), Nr. 9, Seite 268-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2908229

[21] Minty, A.; Chalon, P.; Derocq, J. M.; Dumont, X.; Guillemot, J. C.; Kaghad, M.; Labit, C.; Leplatois, P.; Liauzun, P.; Miloux, B. und et al. (1993): Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses, Nature (Band 362), Nr. 6417, Seite 248-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8096327

[22] Romagnani, S. (1994): Lymphokine production by human T cells in disease states, Annu Rev Immunol (Band 12), Seite 227-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8011282

[23] June, C. H.; Ledbetter, J. A.; Lindsten, T. und Thompson, C. B. (1989): Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes, J Immunol (Band 143), Nr. 1, Seite 153-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2543699

[24] Lindstein, T.; June, C. H.; Ledbetter, J. A.; Stella, G. und Thompson, C. B. (1989): Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway, Science (Band 244), Nr. 4902, Seite 339-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2540528

[25] Fraser, J. D.; Irving, B. A.; Crabtree, G. R. und Weiss, A. (1991): Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28, Science (Band 251), Nr. 4991, Seite 313-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1846244

[26] Linsley, P. S.; Brady, W.; Grosmaire, L.; Aruffo, A.; Damle, N. K. und Ledbetter, J. A. (1991): Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation, J Exp Med (Band 173), Nr. 3, Seite 721-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1847722

[27] Nunes, J. A.; Collette, Y.; Truneh, A.; Olive, D. und Cantrell, D. A. (1994): The role of p21ras in CD28 signal transduction: triggering of CD28 with antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21ras, J Exp Med (Band 180), Nr. 3, Seite 1067-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7520466

[28] Linsley, P. S.; Wallace, P. M.; Johnson, J.; Gibson, M. G.; Greene, J. L.; Ledbetter, J. A.; Singh, C. und Tepper, M. A. (1992): Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule, Science (Band 257), Nr. 5071, Seite 792-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1496399

[29] Walunas, T. L.; Lenschow, D. J.; Bakker, C. Y.; Linsley, P. S.; Freeman, G. J.; Green, J. M.; Thompson, C. B. und Bluestone, J. A. (1994): CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation, Immunity (Band 1), Nr. 5, Seite 405-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7882171

[30] van Seventer, G. A.; Shimizu, Y. und Shaw, S. (1991): Roles of multiple accessory molecules in T-cell activation, Curr Opin Immunol (Band 3), Nr. 3, Seite 294-303. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1910606

[31] Hogg, N. und Landis, R. C. (1993): Adhesion molecules in cell interactions, Curr Opin Immunol (Band 5), Nr. 3, Seite 383-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7688516

[32] Chien, Y. H.; Gascoigne, N. R.; Kavaler, J.; Lee, N. E. und Davis, M. M. (1984): Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene, Nature (Band 309), Nr. 5966, Seite 322-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6328306

[33] Sprent, J.; Lo, D.; Gao, E. K. und Ron, Y. (1988): T cell selection in the thymus, Immunol Rev (Band 101), Seite 173-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3280468

[34] Schwartz, R. H. (1989): Acquisition of immunologic self-tolerance, Cell (Band 57), Nr. 7, Seite 1073-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2525422

[35] Nossal, G. J. (1994): Negative selection of lymphocytes, Cell (Band 76), Nr. 2, Seite 229-39. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8293461

[36] von Boehmer, H. und Kisielow, P. (1993): Lymphocyte lineage commitment: instruction versus selection, Cell (Band 73), Nr. 2, Seite 207-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8097429

[37] Huesmann, M.; Scott, B.; Kisielow, P. und von Boehmer, H. (1991): Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice, Cell (Band 66), Nr. 3, Seite 533-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1868548

[38] Mariathasan, S.; Jones, R. G. und Ohashi, P. S. (1999): Signals involved in thymocyte positive and negative selection, Semin Immunol (Band 11), Nr. 4, Seite 263-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10441212

[39] Vafiadis, P.; Bennett, S. T.; Todd, J. A.; Nadeau, J.; Grabs, R.; Goodyer, C. G.; Wickramasinghe, S.; Colle, E. und Polychronakos, C. (1997): Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus, Nat Genet (Band 15), Nr. 3, Seite 289-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054944

[40] Pugliese, A.; Zeller, M.; Fernandez, A., Jr.; Zalcberg, L. J.; Bartlett, R. J.; Ricordi, C.; Pietropaolo, M.; Eisenbarth, G. S.; Bennett, S. T. und Patel, D. D. (1997): The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes, Nat Genet (Band 15), Nr. 3, Seite 293-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054945

[41] Akkaraju, S.; Ho, W. Y.; Leong, D.; Canaan, K.; Davis, M. M. und Goodnow, C. C. (1997): A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulitis, Immunity (Band 7), Nr. 2, Seite 255-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9285410

[42] Ferber, I.; Schonrich, G.; Schenkel, J.; Mellor, A. L.; Hammerling, G. J. und Arnold, B. (1994): Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen, Science (Band 263), Nr. 5147, Seite 674-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8303275

[43] Kurts, C.; Carbone, F. R.; Barnden, M.; Blanas, E.; Allison, J.; Heath, W. R. und Miller, J. F. (1997): CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity, J Exp Med (Band 186), Nr. 12, Seite 2057-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9396776

[44] Webb, S.; Morris, C. und Sprent, J. (1990): Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity, Cell (Band 63), Nr. 6, Seite 1249-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2148123

[45] Nagata, S. (1994): Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (Band 345), Nr. 1313, Seite 281-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7531345

[46] Dhein, J.; Walczak, H.; Baumler, C.; Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1995): Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95), Nature (Band 373), Nr. 6513, Seite 438-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7530335

[47] Ju, S. T.; Panka, D. J.; Cui, H.; Ettinger, R.; el-Khatib, M.; Sherr, D. H.; Stanger, B. Z. und Marshak-Rothstein, A. (1995): Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation, Nature (Band 373), Nr. 6513, Seite 444-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7530337

[48] Rieux-Laucat, F.; Le Deist, F.; Hivroz, C.; Roberts, I. A.; Debatin, K. M.; Fischer, A. und de Villartay, J. P. (1995): Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity, Science (Band 268), Nr. 5215, Seite 1347-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7539157

[49] Fisher, G. H.; Rosenberg, F. J.; Straus, S. E.; Dale, J. K.; Middleton, L. A.; Lin, A. Y.; Strober, W.; Lenardo, M. J. und Puck, J. M. (1995): Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome, Cell (Band 81), Nr. 6, Seite 935-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7540117

[50] Van Parijs, L. und Abbas, A. K. (1998): Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off, Science (Band 280), Nr. 5361, Seite 243-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9535647

[51] Van Parijs, L.; Peterson, D. A. und Abbas, A. K. (1998): The Fas/Fas ligand pathway and Bcl-2 regulate T cell responses to model self and foreign antigens, Immunity (Band 8), Nr. 2, Seite 265-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9492007

[52] Rathmell, J. C.; Cooke, M. P.; Ho, W. Y.; Grein, J.; Townsend, S. E.; Davis, M. M. und Goodnow, C. C. (1995): CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells, Nature (Band 376), Nr. 6536, Seite 181-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7603571

[53] Griffith, T. S.; Brunner, T.; Fletcher, S. M.; Green, D. R. und Ferguson, T. A. (1995): Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege, Science (Band 270), Nr. 5239, Seite 1189-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7502042

[54] Lamb, J. R.; Skidmore, B. J.; Green, N.; Chiller, J. M. und Feldmann, M. (1983): Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocyte clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin, J Exp Med (Band 157), Nr. 5, Seite 1434-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6189936

[55] Jenkins, M. K. und Schwartz, R. H. (1987): Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo, J Exp Med (Band 165), Nr. 2, Seite 302-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3029267

[56] Pape, K. A.; Merica, R.; Mondino, A.; Khoruts, A. und Jenkins, M. K. (1998): Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance, J Immunol (Band 160), Nr. 10, Seite 4719-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9590217

[57] Rocha, B.; Tanchot, C. und Von Boehmer, H. (1993): Clonal anergy blocks in vivo growth of mature T cells and can be reversed in the absence of antigen, J Exp Med (Band 177), Nr. 5, Seite 1517-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8478622

[58] Fortis, C. und Clementi, E. (1997): Reversible lymphocyte anergy during IL-2 therapy, Immunol Today (Band 18), Nr. 5, Seite 254. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153960

[59] DeSilva, D. R.; Feeser, W. S.; Tancula, E. J. und Scherle, P. A. (1996): Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways, J Exp Med (Band 183), Nr. 5, Seite 2017-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8642312

[60] Li, W.; Whaley, C. D.; Mondino, A. und Mueller, D. L. (1996): Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells, Science (Band 271), Nr. 5253, Seite 1272-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8638107

[61] Perez, V. L.; Van Parijs, L.; Biuckians, A.; Zheng, X. X.; Strom, T. B. und Abbas, A. K. (1997): Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement, Immunity (Band 6), Nr. 4, Seite 411-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9133420

[62] Olivares-Villagomez, D.; Wang, Y. und Lafaille, J. J. (1998): Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis, J Exp Med (Band 188), Nr. 10, Seite 1883-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9815266

[63] Van de Keere, F. und Tonegawa, S. (1998): CD4(+) T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice, J Exp Med (Band 188), Nr. 10, Seite 1875-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9815265

[64] Shevach, E. M. (2002): CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers, Nat Rev Immunol (Band 2), Nr. 6, Seite 389-400. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093005

[65] Wahl, S. M. (1994): Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly, J Exp Med (Band 180), Nr. 5, Seite 1587-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7964446

[66] Buer, J.; Lanoue, A.; Franzke, A.; Garcia, C.; von Boehmer, H. und Sarukhan, A. (1998): Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo, J Exp Med (Band 187), Nr. 2, Seite 177-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9432975

[67] Ohashi, P. S.; Oehen, S.; Buerki, K.; Pircher, H.; Ohashi, C. T.; Odermatt, B.; Malissen, B.; Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1991): Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice, Cell (Band 65), Nr. 2, Seite 305-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1901764

[68] Oldstone, M. B.; Nerenberg, M.; Southern, P.; Price, J. und Lewicki, H. (1991): Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response, Cell (Band 65), Nr. 2, Seite 319-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1901765

[69] Janeway, C. A., Jr. (1992): The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self, Immunol Today (Band 13), Nr. 1, Seite 11-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1739426

[70] Klein, L.; Klugmann, M.; Nave, K. A.; Tuohy, V. K. und Kyewski, B. (2000): Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells, Nat Med (Band 6), Nr. 1, Seite 56-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10613824

[71] Padovan, E.; Casorati, G.; Dellabona, P.; Meyer, S.; Brockhaus, M. und Lanzavecchia, A. (1993): Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells, Science (Band 262), Nr. 5132, Seite 422-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8211163

[72] Malissen, M.; Trucy, J.; Letourneur, F.; Rebai, N.; Dunn, D. E.; Fitch, F. W.; Hood, L. und Malissen, B. (1988): A T cell clone expresses two T cell receptor alpha genes but uses one alpha beta heterodimer for allorecognition and self MHC-restricted antigen recognition, Cell (Band 55), Nr. 1, Seite 49-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3262424

[73] Liu, G. Y.; Fairchild, P. J.; Smith, R. M.; Prowle, J. R.; Kioussis, D. und Wraith, D. C. (1995): Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance, Immunity (Band 3), Nr. 4, Seite 407-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7584132

[74] Sarukhan, A.; Garcia, C.; Lanoue, A. und von Boehmer, H. (1998): Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors, Immunity (Band 8), Nr. 5, Seite 563-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9620677

[75] Miller, S. D.; Vanderlugt, C. L.; Begolka, W. S.; Pao, W.; Yauch, R. L.; Neville, K. L.; Katz-Levy, Y.; Carrizosa, A. und Kim, B. S. (1997): Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading, Nat Med (Band 3), Nr. 10, Seite 1133-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9334726

[76] Perron, H.; Garson, J. A.; Bedin, F.; Beseme, F.; Paranhos-Baccala, G.; Komurian-Pradel, F.; Mallet, F.; Tuke, P. W.; Voisset, C.; Blond, J. L.; Lalande, B.; Seigneurin, J. M. und Mandrand, B. (1997): Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 94), Nr. 14, Seite 7583-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207135

[77] Kamradt, T.; Soloway, P. D.; Perkins, D. L. und Gefter, M. L. (1991): Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein, J Im-

munol (Band 147), Nr. 10, Seite 3296-302. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1719074

[78] Tough, D. F.; Sun, S. und Sprent, J. (1997): T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS), J Exp Med (Band 185), Nr. 12, Seite 2089-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9182680

[79] Jahnke, U.; Fischer, E. H. und Alvord, E. C., Jr. (1985): Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis, Science (Band 229), Nr. 4710, Seite 282-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2409602

[80] Fujinami, R. S. und Oldstone, M. B. (1985): Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity, Science (Band 230), Nr. 4729, Seite 1043-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2414848

[81] Grogan, J. L.; Kramer, A.; Nogai, A.; Dong, L.; Ohde, M.; Schneider-Mergener, J. und Kamradt, T. (1999): Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice, J Immunol (Band 163), Nr. 7, Seite 3764-70. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490973

[82] Reay, P. A.; Kantor, R. M. und Davis, M. M. (1994): Use of global amino acid replacements to define the requirements for MHC binding and T cell recognition of moth cytochrome c (93-103), J Immunol (Band 152), Nr. 8, Seite 3946-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7511662

[83] Scott, B.; Liblau, R.; Degermann, S.; Marconi, L. A.; Ogata, L.; Caton, A. J.; McDevitt, H. O. und Lo, D. (1994): A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity, Immunity (Band 1), Nr. 1, Seite 73-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7889402

[84] Becker, K. G.; Simon, R. M.; Bailey-Wilson, J. E.; Freidlin, B.; Biddison, W. E.; McFarland, H. F. und Trent, J. M. (1998): Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 95), Nr. 17, Seite 9979-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9707586

[85] Concannon, P.; Gogolin-Ewens, K. J.; Hinds, D. A.; Wapelhorst, B.; Morrison, V. A.; Stirling, B.; Mitra, M.; Farmer, J.; Williams, S. R.; Cox, N. J.; Bell, G. I.; Risch, N. und Spielman, R. S. (1998): A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus, Nat Genet (Band 19), Nr. 3, Seite 292-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9662408

[86] Mein, C. A.; Esposito, L.; Dunn, M. G.; Johnson, G. C.; Timms, A. E.; Goy, J. V.; Smith, A. N.; Sebag-Montefiore, L.; Merriman, M. E.; Wilson, A. J.; Pritchard, L. E.; Cucca, F.; Barnett, A. H.; Bain, S. C. und Todd, J. A. (1998): A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom, Nat Genet (Band 19), Nr. 3, Seite 297-300. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9662409

[87] Brackmann, H. H. und Gormsen, J. (1977): Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder, Lancet (Band 2), Nr. 8044, Seite 933. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=72276

[88] Mariani, G.; Ghirardini, A. und Bellocco, R. (1994): Immune tolerance in hemophilia-principal results from the International Registry. Report of the factor VIII and IX Subcommittee, Thromb Haemost (Band 72), Nr. 1, Seite 155-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7974364

[89] Chiller, J. M.; Habicht, G. S. und Weigle, W. O. (1970): Cellular sites of immunologic unresponsiveness, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 65), Nr. 3, Seite 551-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4192271

[90] Levine, S.; Sowinski, R. und Kies, M. W. (1972): Treatment of experimental allergic encephalomyelitis with encephalitogenic basic proteins, Proc Soc Exp Biol Med (Band 139), Nr. 2, Seite 506-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4621748

[91] Keller, R. J.; Eisenbarth, G. S. und Jackson, R. A. (1993): Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type I diabetes, Lancet (Band 341), Nr. 8850, Seite 927-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8096268

[92] Norman, P. S.; Nicodemus, C. F.; Creticos, P. S.; Wood, R. A.; Eggleston, P. A.; Lichtenstein, L. M.; Kagey-Sobotka, A. und Proud, D. (1997): Clinical and immunologic effects of component peptides in Allervax Cat, Int Arch Allergy Immunol (Band 113), Nr. 1-3, Seite 224-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9130529

[93] Bousquet, J.; Lockey, R.; Malling, H. J.; Alvarez-Cuesta, E.; Canonica, G. W.; Chapman, M. D.; Creticos, P. J.; Dayer, J. M.; Durham, S. R.; Demoly, P.; Goldstein, R. J.; Ishikawa, T.; Ito, K.; Kraft, D.; Lambert, P. H.; Lowenstein, H.; Muller, U.; Norman, P. S.; Reisman, R. E.; Valenta, R.; Valovirta, E. und Yssel, H. (1998): Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology, Ann Allergy Asthma Immunol (Band 81), Nr. 5 Pt 1, Seite 401-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9860031

[94] Bertoletti, A.; Sette, A.; Chisari, F. V.; Penna, A.; Levrero, M.; De Carli, M.; Fiaccadori, F. und Ferrari, C. (1994): Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells, Nature (Band 369), Nr. 6479, Seite 407-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8196768

[95] Kawabe, Y. und Ochi, A. (1991): Programmed cell death and extrathymic reduction of Vbeta8+ CD4+ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B, Nature (Band 349), Nr. 6306, Seite 245-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1670963

[96] Schwartz, R. H. (1996): Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?, J Exp Med (Band 184), Nr. 1, Seite 1-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8691122

[97] Jenkins, M. K.; Pardoll, D. M.; Mizuguchi, J.; Quill, H. und Schwartz, R. H. (1987): T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state, Immunol Rev (Band 95), Seite 113-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2437012

[98] Jenkins, M. K.; Chen, C. A.; Jung, G.; Mueller, D. L. und Schwartz, R. H. (1990): Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody, J Immunol (Band 144), Nr. 1, Seite 16-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2153162

[99] Haskins, K.; Kubo, R.; White, J.; Pigeon, M.; Kappler, J. und Marrack, P. (1983): The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody, J Exp Med (Band 157), Nr. 4, Seite 1149-69. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6601175

[100] Shimonkevitz, R.; Colon, S.; Kappler, J. W.; Marrack, P. und Grey, H. M. (1984): Antigen recognition by H-2-restricted T cells. II. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen, J Immunol (Band 133), Nr. 4, Seite 2067-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6332146

[101] Murphy, K. M.; Heimberger, A. B. und Loh, D. Y. (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo, Science (Band 250), Nr. 4988, Seite 1720-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2125367

[102] Pape, K. A.; Kearney, E. R.; Khoruts, A.; Mondino, A.; Merica, R.; Chen, Z. M.; Ingulli, E.; White, J.; Johnson, J. G. und Jenkins, M. K. (1997): Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo, Immunol Rev (Band 156), Seite 67-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9176700

[103] Liblau, R. S.; Pearson, C. I.; Shokat, K.; Tisch, R.; Yang, X. D. und McDevitt, H. O. (1994): High-dose soluble antigen: peripheral T-cell proliferation or apoptosis, Immunol Rev (Band 142), Seite 193-208. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7698794

[104] Burstein, H. J.; Shea, C. M. und Abbas, A. K. (1992): Aqueous antigens induce in vivo tolerance selectively in IL-2- and IFN-gamma-producing (Th1) cells, J Immunol (Band 148), Nr. 12, Seite 3687-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1534821

[105] Rocken, M. und Shevach, E. M. (1996): Immune deviation--the third dimension of nondeletional T cell tolerance, Immunol Rev (Band 149), Seite 175-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9005214

[106] Davis, L. S. und Lipsky, P. E. (1993): Tolerance induction of human CD4+ T cells: markedly enhanced sensitivity of memory versus naive T cells to peripheral anergy, Cell Immunol (Band 146), Nr. 2, Seite 351-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7909723

[107] Sagerstrom, C. G.; Kerr, E. M.; Allison, J. P. und Davis, M. M. (1993): Activation and differentiation requirements of primary T cells in vitro, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 90), Nr. 19, Seite 8987-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8415642

[108] Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family, Annu Rev Immunol (Band 12), Seite 991-1045. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8011301

[109] Kersh, G. J. und Allen, P. M. (1996): Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands, J Exp Med (Band 184), Nr. 4, Seite 1259-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8879197

[110] De Magistris, M. T.; Alexander, J.; Coggeshall, M.; Altman, A.; Gaeta, F. C.; Grey, H. M. und Sette, A. (1992): Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor, Cell (Band 68), Nr. 4, Seite 625-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1739971

[111] Evavold, B. D.; Sloan-Lancaster, J.; Hsu, B. L. und Allen, P. M. (1993): Separation of T helper 1 clone cytolysis from proliferation and lymphokine production using analog peptides, J Immunol (Band 150), Nr. 8 Pt 1, Seite 3131-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8468461

[112] Evavold, B. D. und Allen, P. M. (1991): Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand, Science (Band 252), Nr. 5010, Seite 1308-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1833816

[113] Lyons, D. S.; Lieberman, S. A.; Hampl, J.; Boniface, J. J.; Chien, Y.; Berg, L. J. und Davis, M. M. (1996): A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists, Immunity (Band 5), Nr. 1, Seite 53-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8758894

[114] Van Regenmortel, M. H.; Guichard, G.; Benkirane, N.; Briand, J. P.; Muller, S. und Brown, F. (1998): The potential of retro-inverso peptides as synthetic vaccines, Dev Biol Stand (Band 92), Seite 139-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9554267

[115] Scott, C. A.; Peterson, P. A.; Teyton, L. und Wilson, I. A. (1998): Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues, Immunity (Band 8), Nr. 3, Seite 319-29. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529149

[116] McFarland, B. J.; Sant, A. J.; Lybrand, T. P. und Beeson, C. (1999): Ovalbumin(323-339) peptide binds to the major histocompatibility complex class II I-A(d) protein using two functionally distinct registers, Biochemistry (Band 38), Nr. 50, Seite 16663-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10600129

[117] Robertson, J. M.; Jensen, P. E. und Evavold, B. D. (2000): DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope, J Immunol (Band 164), Nr. 9, Seite 4706-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10779776

[118] Evavold, B. D.; Sloan-Lancaster, J. und Allen, P. M. (1994): Antagonism of superantigen-stimulated helper T-cell clones and hybridomas by altered peptide ligand, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 91), Nr. 6, Seite 2300-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8134391

[119] Evavold, B. D.; Sloan-Lancaster, J.; Wilson, K. J.; Rothbard, J. B. und Allen, P. M. (1995): Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands, Immunity (Band 2), Nr. 6, Seite 655-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7540944

[120] Wucherpfennig, K. W. und Strominger, J. L. (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein, Cell (Band 80), Nr. 5, Seite 695-705. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7534214

[121] Kersh, G. J. und Allen, P. M. (1996): Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen, Nature (Band 380), Nr. 6574, Seite 495-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8606766

[122] Franco, A.; Southwood, S.; Arrhenius, T.; Kuchroo, V. K.; Grey, H. M.; Sette, A. und Ishioka, G. Y. (1994): T cell receptor antagonist peptides are highly effective inhibitors of experimental allergic encephalomyelitis, Eur J Immunol (Band 24), Nr. 4, Seite 940-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7512036

[123] Bercovici, N.; Delon, J.; Cambouris, C.; Escriou, N.; Debre, P. und Liblau, R. S. (1999): Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice, Eur J Immunol (Band 29), Nr. 1, Seite 345-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9933117

[124] Wang, R.; Murphy, K. M.; Loh, D. Y.; Weaver, C. und Russell, J. H. (1993): Differential activation of antigen-stimulated suicide and cytokine production pathways in CD4+ T cells is regulated by the antigen-presenting cell, J Immunol (Band 150), Nr. 9, Seite 3832-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7682585

[125] Critchfield, J. M.; Racke, M. K.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Cannella, B.; Raine, C. S.; Goverman, J. und Lenardo, M. J. (1994): T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis, Science (Band 263), Nr. 5150, Seite 1139-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7509084

[126] Mueller, D. L.; Jenkins, M. K. und Schwartz, R. H. (1989): Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, Annu Rev Immunol (Band 7), Seite 445-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2653373

[127] Jenkins, M. K.; Mueller, D.; Schwartz, R. H.; Carding, S.; Bottomley, K.; Stadecker, M. J.; Urdahl, K. B. und Norton, S. D. (1991): Induction and maintenance of anergy in mature T cells, Adv Exp Med Biol (Band 292), Seite 167-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1950767

Anhang

10 Anhang

10.1 Abkürzungen und Molekulargewichte für Aminosäuren

Tabelle 10.1 Abkürzungen und Molekulargewichte für Aminosäuren nach IUPAC (= engl. International Union of Pure and Applied Chemistry)

Aminosäure	3-Buchstaben Code	1-Buchstaben Code	Molekular-gewicht [D]
Alanin	Ala	**A**	89
Arginin	Arg	**R**	174
Aspargin	Asn	**N**	132
Asparginsäure	Asp	**D**	133
Cystein	Cys	**C**	121
Glutamine	Gln	**Q**	146
Glutaminsäure	Glu	**E**	147
Glycin	Gly	**G**	175
Histidin	His	**H**	155
Isoleucin	Ile	**I**	131
Leucin	Leu	**L**	131
Lysin	Lys	**K**	146
Methionin	Met	**M**	149
Phenylanalin	Phe	**F**	165
Prolin	Pro	**P**	115
Serin	Ser	**S**	105
Threonin	Thr	**T**	119
Tryptophan	Trp	**W**	204
Tyrosin	Tyr	**Y**	181
Valin	Val	**V**	117

Erklärung an Eides statt

11 Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation „D-Aminosäuren-substituierte Peptidepitope induzieren T-Zell-Toleranz *in vivo*“ von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin November 2002

Johannes Falk