

Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten durch Infektion und Autoimmunität

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Thomas Kamradt

geboren am 13.12.1959 in Moers/Rhein

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

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

Eingereicht am 4.10.2000

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. H.H. Peter, Freiburg
2. Prof. Dr. med. R.E. Schmidt, Hannover

„Zutreffend aber heißt es hier ‚wieder und weiter‘, denn mit unserer Forscherangelegenlichkeit treibt das Unerforschliche eine Art von foppendem Spiel: es bietet ihr Scheinhalte und Wegesziele, hinter denen, wenn sie erreicht sind, neue ... Strecken sich auf tun, wie es dem Küstengänger ergeht, der des Wanderns kein Ende findet, weil hinter jeder...Dünenkulisse, die er erstrebte, neue Weiten... vorwärtslocken.“

Thomas Mann: „Joseph und seine Brüder. Die Geschichten Jakobs“

Inhaltsverzeichnis

AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN DURCH INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT.....	1
EXPERIMENTELLE MEDIZIN.....	1
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2. EINLEITUNG.....	7
2.1 VON DER INFEKTION ZUR AUTOIMMUNITÄT?.....	7
2.1.1 <i>Lyme-Arthritis</i>	10
2.1.2 <i>Experimentell autoimmune Enzephalitis (EAE)</i>	11
2.2 DIFFERENZIERUNG VON TH-ZELLEN BEI INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT.....	11
2.2.1 <i>Unterschiedliche Subpopulationen von T-Helferzellen</i>	11
2.2.2 <i>Identifizierung unterschiedlicher T-Helferzell Subpopulationen ex vivo</i>	13
2.2.3 <i>Ko-Expression verschiedener Zytokine in vivo</i>	13
3. ERGEBNISSE.....	15
3.1 AKTIVIERUNG VON TH-ZELLEN BEI INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT.....	15
3.1.1 <i>Lyme Arthritis</i>	15
3.1.1.1 B. Lengl-Janßen, et al., <i>J. Exp. Med.</i> 180, 2069-2078 (1994).....	15
3.1.1.2 T. Kamradt, et al., <i>Infect. Immun.</i> 64, 1284-1289 (1996).....	16
3.1.1.3 B. Maier, et al., <i>Eur. J. Immunol.</i> 30, 448-457 (2000).....	17
3.1.2 <i>Experimentell autoimmune Enzephalitis</i>	18
3.1.2.1 J. L. Grogan, et al., <i>J. Immunol.</i> 163, 3764-3770 (1999).....	18
3.2 DIFFERENZIERUNG VON TH ZELLEN BEI INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT.....	19
3.2.1 <i>Lyme Arthritis</i>	19
3.2.1.1 C. Infante-Duarte, T. Kamradt, <i>Infect. Immun.</i> 65, 4094-4099 (1997).....	19
3.2.2 <i>Detektion und Modulation der Th-Differenzierung in vivo</i>	20
3.2.2.1 M. Löhning, et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 95, 6930-6935 (1998).....	20
3.2.2.2 M. Löhning, et al., <i>J. Immunol.</i> 162, 3882-3889 (1999).....	21
4. DISKUSSION.....	22
4.1 AKTIVIERUNG VON TH-ZELLEN BEI INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT: MOLEKULARE MIMIKRY ALS URSACHE FÜR AUTOIMMUNITÄT?.....	22
4.1.1 <i>Strukturelle Kriterien und nicht Sequenzhomologie der potenzielle erkannten Peptide sind entscheidend für die Kreuzreaktivität von T-Zellen.</i>	24
4.1.2 <i>Kreuzreaktivität von Th-Zellen ist häufig.</i>	26
4.1.3 <i>... aber zumeist ohne pathologische Konsequenzen</i>	26
4.1.4 <i>„Bystander Aktivierung“?</i>	27
4.1.5 <i>Konsequenzen für die Molekulare Mimikry Hypothese</i>	28
4.1.6 <i>Konsequenzen für die Pathogenese der therapieresistenten Lyme Arthritis</i>	30
4.2 EX VIVO DETEKTION DER TH-DIFFERENZIERUNG BEI INFEKTION UND AUTOIMMUNITÄT: MÖGLICHKEIT ZUR SPEZIFISCHEN IMMUNMODULATION?.....	31
4.2.1 <i>Ex vivo Detektion der Th-Differenzierung bei Infektion und Autoimmunität: wie häufig sind Th1 und Th2 Zellen in vivo?</i>	32
5. LITERATUR.....	35
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	44
7. DANKSAGUNG.....	45

1. Zusammenfassung

In den entwickelten Industrienationen leiden annähernd 5% der Bevölkerung an einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie z.B. rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I, oder chronisch entzündliche Darmkrankheit. So unterschiedlich die klinischen Manifestationen dieser Erkrankungen auch sind, T-Helfer (Th) Lymphozyten sind entscheidend an der Pathogenese der verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Die Prävalenz allergischer Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale oder atopische Dermatitis, bei denen ebenfalls Th Zellen eine entscheidende Rolle spielen, ist noch höher. Derzeit sind schätzungsweise 30% aller Europäer von einer allergischen Erkrankung betroffen und die Prävalenz, insbesondere bei Kindern, ist steigend. Trotz der enormen medizinischen und psychosozialen Bedeutung dieser Erkrankungen sind kausale Therapien bislang nicht möglich. Die medikamentöse Behandlung besteht im wesentlichen aus zytotoxischen Immunsuppressiva und Kortikoiden. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur Aktivierung und Differenzierung von Th Zellen ist Voraussetzung für die Entwicklung spezifischer und möglichst kausaler Therapieansätze bei chronisch entzündlichen und allergischen Erkrankungen.

In der vorliegenden Schrift werden unsere Arbeiten zur Aktivierung und Differenzierung von Th Zellen in Infektion und Autoimmunität dargestellt. Nach der Einleitung werden im Ergebnisteil 7 Originalarbeiten aus den Jahren 1994 –2000 abgedruckt¹. Den Originalarbeiten ist jeweils eine knappe Einleitung vorangestellt, die den Zusammenhang mit den anderen Publikationen darstellt und die wesentlichen Ergebnisse zusammenfaßt. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit werden die zuvor dargestellten Ergebnisse zusammenfassend diskutiert und es wird dargestellt, welche Perspektiven sich aus diesen Ergebnissen ergeben und welche Untersuchungen im Labor des Autors dementsprechend derzeit durchgeführt werden.

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Teile: im ersten Teil wird untersucht, wie autoreaktive T-Lymphozyten durch mikrobielle Antigene aktiviert werden und welche Folgen diese Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten haben kann. Im zweiten Teil wird untersucht wie Infektionserreger die funktionelle Differenzierung von T-Helfer (Th)-Zellen beeinflussen und welche pathologischen Konsequenzen sich daraus ergeben können. Darüber hinaus wird im zweiten Teil der Arbeit dargestellt, wie die funktionelle Differenzierung von Th-Zellen *ex vivo* untersucht wird und welche therapeutischen Ansätze sich aus der Kenntnis dieser Zusammenhänge ergeben.

1) Autoimmunität als Folge der Immunantwort auf Infektionen?

Wir haben untersucht, ob kreuzreaktive T-Helfer (Th) Zellen, die sowohl mikrobielle (oder virale)² Antigene, als auch körpereigene Antigene erkennen können, für die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten von Belang sind. Diese Frage haben wir in zwei Modellsystemen untersucht. Im ersten Ansatz sind wir von einem bekannten mikrobiellen Antigen ausgegangen und haben untersucht, ob Th-Zellen, die dieses mikrobielle Antigen erkennen, zusätzlich auch Autoantigene erkennen können. Im zweiten Ansatz sind wir von einem

¹ Der Autor dieser Schrift ist verantwortlicher Autor (corresponding author) für die abgedruckten Arbeiten.

² Der Einfachheit halber wird im folgenden von "mikrobiellen" Antigenen gesprochen, wenn Antigene von Bakterien, Pilzen, Viren, Helminthen oder Protozoen gemeint sind.

Autoantigenen ausgegangen, dass von pathogenetischer Bedeutung im Mausmodell der autoimmunen Enzephalitis ist.

Bei der durch *Borrelia burgdorferi* verursachten Lyme Borreliose wird vermutet, dass die Immunantwort des Patienten für die gelegentlich auftretenden chronischen Verläufe mitverantwortlich ist. Ein Antigen von *Borrelia burgdorferi*, das im Verdacht steht eine „arthritogene“ Immunantwort induzieren zu können und damit eine chronische Lyme-Arthritis zu begünstigen, ist das „Outer surface protein A“ (OspA). Wir haben untersucht, ob OspA-spezifische Th-Zellen auch Selbstantigen erkennen. Diese Untersuchungen wurden teils an Patienten-Lymphozyten und teils im Mausmodell durchgeführt.

Bei der multiplen Sklerose und ebenso in ihrem Mausmodell, der experimentell autoimmunen Enzephalitis (EAE), wird das basische Myelinprotein (MBP) von enzephalitogenen Th-Zellen erkannt. Wir haben im Mausmodell untersucht, ob MBP-spezifische Th-Zellen auch von mikrobiellen Antigenen aktiviert werden können.

Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen Peptiden und Selbstantigenen ist häufig. Ein von uns untersuchter autoreaktiver T-Zellklon ließ sich durch über 60 verschiedene mikrobielle Peptide ebensogut aktivieren wie durch sein „spezifisches“ Autoantigen.
- Kreuzreaktivität kann pathogen sein. Die von uns untersuchten kreuzreaktiven mikrobiellen Peptide induzierten Enzephalitis mit der gleichen Kinetik und dem gleichen Schweregrad wie das enzephalitogene Autoantigen (MBP-Peptid).
- Sequenzhomologie ist kein hinreichendes Kriterium für Kreuzreaktivität. Die meisten der von uns identifizierten kreuzreaktiven Selbst- oder mikrobiellen Peptide wären bei einer Suche nach Sequenzhomologie nicht gefunden worden. Strukturelle Kriterien entscheiden darüber, welche Peptid/MHC-Komplexe von einem individuellen T-Zellrezeptor erkannt werden.
- Peptid-Kreuzreaktivität ist für sich genommen nicht als pathogenetisch bedeutsam zu werten. Selbst wenn, wie in einigen unserer Beispiele, die Immunisierung mit dem kreuzreaktiven Peptid eine Autoimmunerkrankung hervorzurufen vermag, ist ungewiß, ob das in Frage stehende Peptid auch *in vivo* prozessiert wird. Selbst wenn, wie in zumindest einem unserer Beispiele, das kreuzreaktive Peptid auch *in vivo* prozessiert wird, begründet das noch nicht zwangsläufig einen pathogenetischen Zusammenhang.
- Die herkömmliche Vorstellung, dass Autoimmunität durch immunologische Kreuzreaktivität zwischen einem definierten Selbstantigen und einem definierten mikrobiellen Antigen hervorgerufen wird, ist möglicherweise zu einfach.
- Dennoch bleibt festzuhalten, dass weder unsere eigenen, noch andere bislang publizierten Arbeiten, die molekulare Mimikry als Pathomechanismus in der Genese von Autoimmunerkrankheiten ausschließen.

Alternativ zur immunologischen Kreuzreaktivität („molekulare Mimikry“) wird die Induktion eines „proinflammatorischen Milieus“, z.B. durch Zytokin-Imbalance („Bystander activation“) als ein möglicher Mechanismus der infektionsinduzierten Autoimmunität diskutiert. Diese Möglichkeit haben wir ebenfalls am Beispiel von *B. burgdorferi* untersucht und gefunden, dass *B. burgdorferi* in der Lage ist, Th-Zellen unabhängig von der Antigen-spezifität ihres Rezeptors zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie

Interferon (IFN)- γ und Interleukin (IL)-17 zu induzieren. Im Modell der experimentell autoimmunen Enzephalitis fanden wir, das bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) in der Lage ist, eine kleine aber funktionell signifikante Th-Zellpopulation zur Proliferation anzuregen. In unserem transgenen Modell konnten wir auch durch die Injektion von Lipopolysaccharid eine experimentell autoimmune Enzephalitis induzieren.

Diese beiden verschiedenen Mechanismen: „Bystander Aktivierung“ von T-Zellen durch massive polyklonale B-Zellaktivierung und zweitens die Induktion proinflammatorischer Zytokine könnten antigen-unspezifisch von der Infektion zur Autoimmunität führen. Die Hypothesen der molekularen Mimikry und der „Bystander Aktivierung“ schließen sich gegenseitig keinesfalls aus. Es ist im Gegenteil gut vorstellbar, dass diese unterschiedlichen Mechanismen in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten zusammenwirken (vgl. Abschnitt4 „Diskussion“).

2) Detektion und Modulation der Th-Differenzierung *in vivo*

Angesichts der großen Bedeutung der Th-Zytokine für die Regulation von Infektion und Autoimmunität wäre es von großer Bedeutung lebende Th1 oder Th2 Zellen *ex vivo* identifizieren, charakterisieren und möglichst auch modulieren zu können. Ein von uns funktionell charakterisiertes Molekül, T1/ST2, wird *in vitro* und *in vivo* präferentiell auf Th2 Zellen exprimiert und ist für die Funktion dieser Zellen von Bedeutung. Durch Injektion löslichen T1/ST2s oder von Antikörper gegen T1/ST2 konnten wir die Symptome der experimentell induzierten bronchialen Hyperreaktivität bei Mäusen drastisch reduzieren.

Wie im Abschnitt 3.2.2 dargelegt wird ist T1/ST2 aufgrund dieser und anderer Befunde ein Kandidat für therapeutische Interventionen auch beim Menschen. Teil unserer gegenwärtigen Bemühungen ist deshalb die immunologische Charakterisierung des humanen T1/ST2 Moleküls und die Identifikation des bislang noch unbekanntes Liganden für T1/ST2.

Das wichtigste Ergebnisse dieses Abschnittes ist also:

- Die Identifikation eines Oberflächenmoleküls, T1/ST2, das präferenziell von Th2 Zellen exprimiert wird und für die Funktion dieser Zellen von Bedeutung ist.

2 Einleitung

2.1 Von der Infektion zur Autoimmunität?

Vor mehr als hundert Jahren wurde im Boston Medical and Surgical Journal, dem heutigen New England Journal of Medicine, ein Fallbericht publiziert, der das Auftreten von Diabetes unmittelbar nach der Mumpserkrankung eines 39-jährigen Patienten beschrieb (1). Der Autor beendete seinen Bericht mit der Vermutung „*there is ... suspicion that the former disease may be induced by the latter.*“ Seither wurden reichlich klinische (2, 3), epidemiologische (4, 5) und experimentelle (6-8) Hinweise darauf, dass Infektion und Autoimmunität möglicherweise zusammenhängen, gesammelt (Übersicht in (9)).

Bis heute ist allerdings unbekannt wie Infektionskrankheiten Autoimmunität verursachen oder Schübe chronisch rezidivierender Autoimmunkrankheiten veranlassen können.

Autoreaktive T- und B- Lymphozyten sind Bestandteil des normalen Repertoires sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen (10-12). Verschiedene immunologische Regulationsmechanismen gewährleisten normalerweise, dass diese autoreaktiven Zellen keine Autoimmunerkrankungen verursachen (Übersichten in (13, 14)). Ein kritischer Punkt in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen ist also die Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen. Verschiedene Mechanismen, die zur Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen führen können sind vorstellbar (Übersicht in (14)). Sie lassen sich in zwei Kategorien einteilen, Antigen-unspezifische und Antigen-spezifische Mechanismen (**Tab. 1**).

Tabelle 1 Mögliche Pathomechanismen für infektionsbedingte Autoimmunität				
	Auslöser	Mechanismus	Beispiel	Ref.
Antigen-unspezifisch	Gewebezerstörung	Freisetzung sequestrierter Selbstantigene	Theilers Enzephalitis Virus	(15)
	„Bystander-Aktivierung“	Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten	Virusinfektionen	(16)
Antigen-spezifisch	Superantigene	Massive T-Zellaktivierung	Multiple Sklerose	(26)
	Kreuzreaktivität (Molekulare Mimikry)	Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten	Rheumatisches Fieber?	(2)

Zu den Antigen-unspezifischen Mechanismen, mit denen Infektionserreger Autoimmunität begünstigen könnten, zählen die direkte Gewebeerstörung und die sogenannte „Bystander-Aktivierung“. Ein Beispiel für die Induktion von Autoimmunität durch virusbedingte Gewebeerstörung bietet die chronische Infektion von Mäusen mit Theilers Enzephalitis Virus. Bedingt durch zytopathische Effekte des Virus werden ZNS-Autoantigene, die normalerweise sequestriert sind, d.h. vom Immunsystem „ignoriert“

werden, freigesetzt. Dadurch können autoreaktive Lymphozyten, die diese Autoantigene erkennen, aktiviert werden (15). Immunologische „Ignoranz“, d.h. die Sequestrierung von Autoantigenen, die anderenfalls von autoreaktiven Lymphozyten erkannt werden könnten, ist ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegen Selbstantigene (14). Die virusbedingte Freisetzung solcher normalerweise sequestrierten Selbstantigene kann ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Autoimmunität sein (14, 15).

Ein anderer Mechanismus durch den Infektionskrankheiten zur Autoimmunität führen könnten, ist die sogenannte „Bystander-Aktivierung“. Es ist denkbar, dass Infektionen, z.B. durch die Induktion von Zytokinen oder ko-stimulatorischen Molekülen, ein „proinflammatorisches Milieu“ induzieren können, in dem normalerweise tolerante autoreaktive T Zellen aktiviert werden können. Ein Beispiel für Bystander-Aktivierung ist die Aktivierung von CD8⁺ Lymphozyten unabhängig von ihrer Antigen-spezifität durch virus-induziertes Interferon (IFN)- α (16, 17). In letzter Zeit wurden diese Befunde etwas in Zweifel gezogen, weil die Visualisierung antigenspezifischer T-Lymphozyten mit MHC/Peptid-Tetrameren keine Anhaltspunkte für die Bystander Aktivierung liefern konnte (18, 19). Gleichzeitig ist aber auch klar geworden, dass neben der Induktion von IFN- α verschiedene virale und mikrobielle Moleküle potente Immunmodulatoren sind, die starke Adjuvans-Eigenschaften haben, z.B. Lipopolysaccharid (LPS) (20), Lipoproteine (21), Toxine (22), unmethylierte bakterielle CpG DNA (23), oder doppelsträngige viraler RNA (24), so dass das Konzept der Antigen-unspezifischen Bystander-Aktivierung weiterhin attraktiv bleibt.

Zu den antigenspezifischen Mechanismen die eine Induktion von Autoimmunität nach Infektionen verursachen könnten, zählen bakterielle und virale Superantigene, sowie die immunologische Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen und Selbstantigenen (molekulare Mimikry). Superantigene aktivieren einen großen Teil des T-Zellrepertoires (25), typischerweise > 20% aller peripheren T-Zellen. Es ist vorstellbar, dass unter diesen T-Zellen auch autoreaktive Zellen sind, die, einmal durch das Superantigen aktiviert, auch durch die Erkennung von Selbstantigenen aktiviert werden und dadurch Autoimmunkrankheiten verursachen können. Zwar ist ein retrovirales Superantigen in der Pathogenese der multiplen Sklerose vorgeschlagen worden (26) es fehlen aber bis heute schlüssige Beweise für diese Hypothese. Gegen die Möglichkeit der Induktion von Autoimmunität durch Superantigene sprechen dagegen andere Befunde, die zeigen, dass der überwiegende Teil der Zellen, die durch Superantigene aktiviert werden unmittelbar danach durch Apoptose beseitigt wird während der überlebende Restanteil dieser Zellfraktion anerg wird (27).

Eine andere Hypothese schlägt vor, dass durch Infektionen dem Immunsystem des Wirtsorganismus antigene Peptide von Mikroorganismen oder Viren präsentiert werden, deren Aminosäuresequenz einem Selbstantigen des Wirtes so ähnlich ist, dass T-Zellen, die durch das mikrobielle Antigen aktiviert wurden, in der Folge auch in der Lage sind, Zellen, die das homologe Selbstantigen präsentieren zu erkennen und zu zerstören (7, 28, 29). Die folgende **Abb.1** faßt diese Hypothese der molekularen Mimikry zusammen:

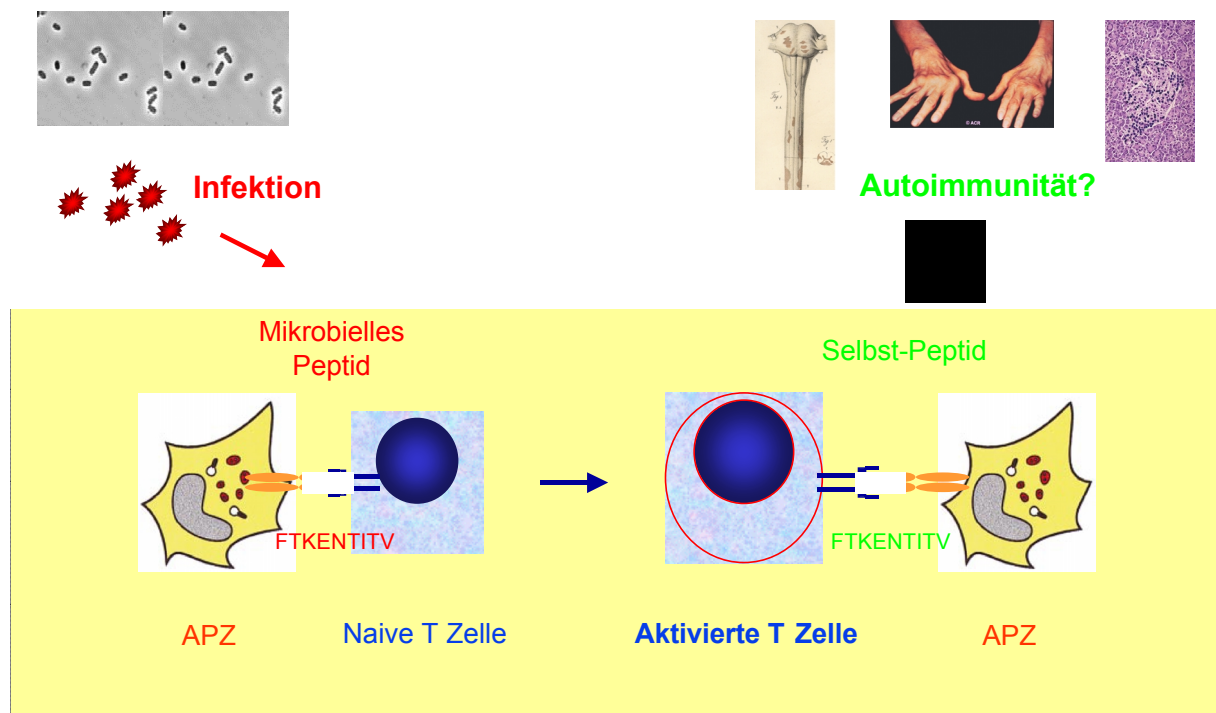


Abbildung 1: Molekulare Mimikry. Während einer Infektion werden mikrobielle Proteine von den Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des Wirtes aufgenommen, proteolytisch verdaut und gebunden an MHC-Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der APZ den Th-Zellen präsentiert. Eine naive Th-Zelle, deren klonaler T-Zellrezeptor (TZR) spezifisch für den dargebotenen Peptid/MHC-Komplex ist, bindet diesen Komplex auf der Oberfläche der APZ und wird aktiviert. Die Hypothese der molekularen Mimikry sagt nun voraus, dass diese – einmal aktivierte – Th Zelle im folgenden auch in der Lage ist Selbstantigene, die dem mikrobiellen Peptid „ähneln“ zu erkennen. „Ähnlichkeit“ bedeutet hier Identität oder Homologie der Aminosäuresequenz beider Peptide (in der Abb. symbolisiert als eine fiktive Sequenz FTKENTIV³). Diese T-Zellaktivierung durch Selbstantigene induziert dann Autoimmunität, d.h. Organschäden, in der Abbildung symbolisiert durch Demyelinisierungen im Rückenmark (wie bei multipler Sklerose), das typische klinische Bild einer rheumatoiden Arthritis und die Zerstörung einer Langerhans'schen Insel im Pankreas durch lymphozytäre Infiltration wie bei Typ I Diabetes.

Trotz der Plausibilität und der Popularität dieser Hypothese muss angemerkt werden, dass in den nunmehr fast zwanzig Jahren seit ihrer Formulierung in der oben dargestellten Form (7) zwar Anhaltspunkte, aber keinerlei schlüssige Beweise dafür, dass dieser Mechanismus *in vivo* für die Entstehung von Autoimmunerkrankheiten von Belang ist, erbracht werden konnten. Dies gilt auch für das akute rheumatische Fieber von dem seit langem angenommen wird,

³ Ein-Buchstabenkode für Aminosäuren

dass es durch Kreuzreaktivität von Streptokokken Antigenen mit Antigen im Gelenk und/oder den Herzklappen verursacht wird (2).

Neuere Methoden der Peptidsynthese ermöglichen es hunderte von verschiedenen Peptiden gleichzeitig zu synthetisieren. Dadurch wurde es erstmals möglich, die Erkennung einer großen Zahl verschiedener Peptide durch einen definierten T-Zellrezeptor zu prüfen. Die im Abschnitt 3.1 dargestellten Arbeiten hatten zum Ziel die Hypothese der molekularen Mimikry durch den Einsatz moderner Peptidsyntheseverfahren systematisch zu überprüfen. Wir haben diese Untersuchungen in zwei verschiedenen Modellsystemen durchgeführt. Erstens haben wir untersucht, ob Th-Zellen die ein definiertes bakterielles Antigen (OspA von *Borrelia burgdorferi*) erkennen, durch Kreuzreaktivität, d.h. die gleichzeitige Erkennung von Selbstantigenen, Autoimmunität verursachen können. Zweitens haben wir untersucht, ob enzephalitogene Th-Zellen, die ein definiertes Selbstantigen (basisches Myelinprotein) erkennen, durch mikrobielle Antigene aktiviert werden können. Diese beiden Systeme werden im folgenden kurz vorgestellt.

2.1.1 Lyme-Arthritis

Die Lyme-Borreliose wird durch eine Infektion mit der von Zecken übertragenen Spirochäte *Borrelia burgdorferi* verursacht. Es handelt sich um eine Multi-Systemerkrankung, die vor allem an Haut, Nervensystem, Muskeln und Gelenken Symptome verursacht (Übersicht in (30)). Die lokale Infektion zeigt sich in Form des Erythema migrans, ein sich zentrifugal ausbreitendes, ringförmiges Erythem mit zentraler Abblassung, das meist etwa eine bis vier Wochen nach dem Zeckenbiß auftritt. Unter antibiotischer Therapie verschwindet das Erythema migrans innerhalb weniger Tage, aber auch unbehandelt bildet es sich im Verlaufe einiger Tage bis Wochen zurück. Ausgehend von dieser Hautläsion kommt es zur meist hämatogenen Dissemination der Erreger mit konsekutivem Befall verschiedener Organe. Die rheumatologischen Frühsymptome sind in dieser Phase typischerweise flüchtig und äußern sich durch „wandernde“, zum Teil heftige Arthralgien und Myalgien, die jeweils wenige Stunden bis einige Tage lang anhalten. Gelenkschwellungen werden in diesem Stadium nur selten beobachtet. Etwa 60 Prozent der unbehandelten Patienten mit Erythema migrans erkranken im weiteren Verlauf an einer Arthritis, wie Beobachtungen des Spontanverlaufes der Lyme-Borreliose vor Entdeckung des Erregers zeigten (31). Typischerweise handelte es sich bei der Lyme-Arthritis um eine rezidivierende Mono- oder Oligoarthritis, hauptsächlich der großen Gelenke im Bereich der unteren Extremitäten. Bei fast allen Patienten wird im Verlaufe der Erkrankung ein Kniegelenk befallen. Es können aber auch nur heftige Arthralgien ohne erkennbare Synovitiden bestehen. Ein symmetrischer Befall kleiner Gelenke wie bei der rheumatoiden Arthritis ist selten (32). Durch adäquate antibiotische Therapie werden etwa 90 Prozent der Patienten geheilt. Bei etwa 10 Prozent der Patienten dauert die Arthritis trotz Behandlung jedoch ein Jahr oder länger. Dieses Krankheitsbild wird als therapieresistente Lyme-Arthritis bezeichnet (33). Zwei Pathomechanismen, die sich gegenseitig nicht ausschließen, kommen als Ursache für die therapieresistenten Verläufe der Lyme-Arthritis in Betracht: Erregerpersistenz oder eine durch *B. Borrelia burgdorferi* induzierte pathogene Immunantwort des Wirtes (Übersichten in (34, 35)). Zu Beginn der im folgenden dargestellten Arbeiten war bekannt, dass Borrelien nur äußerst selten aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme Arthritis zu isolieren waren; ebenso war es nur

wenigen Einzelfällen gelungen Borrelien in der entzündeten Synovialis mikroskopisch darzustellen (Übersicht in (34, 35)). Einen wichtigen Hinweis auf eine mögliche Immunpathogenese der therapieresistenten Lyme-Arthritis ergab die PCR-Diagnostik: während Borrelien-DNA in über 95% der Fälle aus der Synovialflüssigkeit von Patienten vor Beginn der antibiotischen Therapie nachgewiesen werden konnte gelang der Nachweis nur bei einer kleinen Minderheit der Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis nach antibiotischer Therapie (36). Später wurde allerdings gezeigt, dass in einigen Fällen, in denen Borrelien-DNA in der Synovialflüssigkeit nicht nachweisbar ist, der Nachweis aus der Synovialis gelingen kann (37). Weitere Hinweise auf eine mögliche Immunpathogenese der therapieresistenten Lyme Arthritis waren die Tatsache, dass HLA-DR4 positive Patienten mit Lyme Arthritis ein signifikant höheres Risiko für eine therapieresistente Verlaufsform haben als HLA-DR4 negative Lyme-Arthritis Patienten (38).

2.1.2 Experimentell autoimmune Enzephalitis (EAE)

Die experimentell autoimmune Enzephalitis EAE ist ein Mausmodell für die multiple Sklerose im speziellen und für T-zellvermittelte Autoimmunkrankheiten generell. Pathophysiologisch ist die EAE gekennzeichnet durch Demyelinisierungen im ZNS der erkrankten Tiere. Verursacht werden diese Demyelinisierungen von Th Zellen, die bestimmte ZNS-Autoantigene, u.a. basisches Myelinprotein (MBP) erkennen. Klinisches Korrelat der Demyelinisierungen sind aufsteigende Lähmungen bis hin zur Quadraplegie der erkrankten Tiere. Die von den enzephalitogenen T-Zellen der suszeptiblen Mausstämmen erkannten MBP-Epitope sind bekannt. Auch bei der multiplen Sklerose gibt es deutliche Hinweise darauf, dass MBP-spezifische Th-Zellen an der Pathogenese beteiligt sind (Übersichten in (39, 40)).

Mäuse mit dem MHC-Klasse II Haplotyp H-2^u sind für EAE suszeptibel. Die enzephalitogenen T-Zellen erkennen die N-terminalen 11 Aminosäuren des murinen MBP, die N-terminale Acetylierung ist dabei für die Antigenerkennung wichtig (41). Für unsere Untersuchungen setzten wir Mäuse ein, die transgen für einen MBP_{Ac1-11}-spezifischen T-Zellrezeptor sind (8). Um experimentelle Einflüsse anderer, nicht MBP_{Ac1-11}-spezifischer T-Zellrezeptoren auszuschließen, verwenden wir TZR-transgene Mäuse, die mit Mäusen gekreuzt wurden, die keine endogenen $\alpha\beta$ T-Zellen produzieren (TCR $C\alpha^{-/-}$ Mäuse) (42). Deshalb haben die von uns verwendeten Mäuse keine anderen $\alpha\beta$ T-Zellen außer den transgenen T-Zellen. Wir haben untersucht, welche mikrobiellen Antigene von MBP-spezifischen T-Zellen erkannt werden können.

2.2 Differenzierung von Th-Zellen bei Infektion und Autoimmunität

2.2.1 Unterschiedliche Subpopulationen von T-Helferzellen

T-Helferzellen (Th) nehmen durch ihre Zytokinproduktion entscheidenden Einfluß auf den Verlauf sowohl von Infektionskrankheiten als auch von Autoimmunerkrankungen. Th-Zellen können anhand ihrer Zytokinproduktion in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Eine vereinfachte Einteilung in Th1- und Th2-Zellen hat sich als nützlich zum Verständnis physiologischer und pathologischer Immunantworten erwiesen (Übersichten in (43-45)). Th1-Zellen produzieren hauptsächlich Interferon (IFN)- γ , Tumornekrosefaktor (TNF)- β (Lymphotoxin) oder Interleukin (IL)-2. Diese Zytokine werden einerseits zur Überwindung intrazellulärer Infektionen benötigt, sind aber andererseits auch mitverantwortlich für die

Gewebezerstörung bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5 und IL-13, sind zur Bekämpfung parasitärer Erkrankungen notwendig, spielen aber andererseits eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen (43-45). Verschiedene Faktoren, vor allem aber Zytokine, entscheiden darüber, ob eine undifferenzierte Vorläuferzelle sich entweder zu einer Th1- oder einer Th2-Zelle entwickelt (46)(vgl. auch **Abb. 2**).

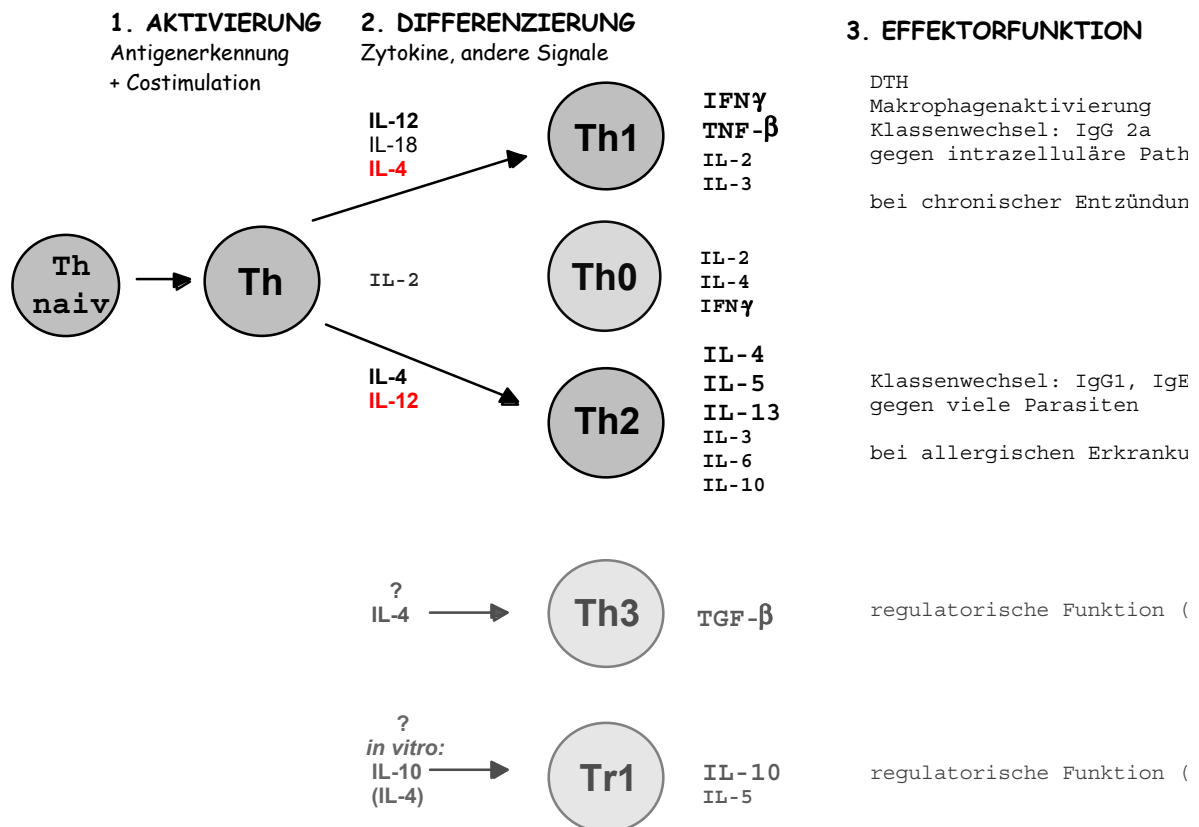


Abb. 2 zeigt **Th-Populationen**, charakteristische von ihnen sezernierte Zytokine und die für die Entwicklung entscheidenden Faktoren, soweit diese bekannt sind. Die in rot dargestellten Zytokine hemmen die Entwicklung, die in schwarzer Farbe gezeichneten fördern sie. Tr bezeichnet „regulatory T-cells“.

Th-Zellen, die andere als die prototypischen Th1- oder Th2-Zytokine produzieren, sind beschrieben und als Th0 (47), Th3 (48) oder Tr1 (49) bezeichnet worden. Th0-Zellen können sowohl Typ 1- als auch Typ 2-Zytokine produzieren, und es ist gegenwärtig noch unklar, ob diese Zellen ein Entwicklungsstadium während der Differenzierung von Vorläuferzellen in Th1- oder Th2-Zellen darstellen, ob es sich bei den Th0-Zellen um eine stabil differenzierte Population oder um verschiedene Subpopulationen handelt (43, 47, 50). Th3-Zellen produzieren vor allem TGF- β und sollen die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen verhindern (48). Auch *in vitro* polarisierten Tr1-Zellen, gekennzeichnet durch die Produktion von IL-10 und IL-5, wird eine immunsupprimierende Wirkung zugeschrieben (49).

Mikroorganismen und Viren können im Wirtsorganismus die Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren. In ausreichender Menge produziert können proinflammatorische Zytokine für sich alleine chronisch entzündliche Erkrankungen verursachen. Ein instruktives Beispiel sind Mäuse die humanes TNF- α transgen exprimieren und spontan eine Arthritis entwickeln (51). Die transgene Expression von IFN- γ im ZNS hat die Entwicklung einer demyelinisierenden Erkrankung zur Folge (52). Aber auch Infektionen können die Zytokinbalance des Wirtsorganismus so empfindlich stören, dass chronisch entzündliche Veränderungen die Folge sind. Herpes simplex virus (HSV) Typ 1 z.B. induziert in die herpetische Keratitis. Im Mausmodell wurde diese Erkrankung im allgemeinen als Autoimmunkrankheit angesehen und es wurde vermutet, dass molekulare Mimikry zwischen einem HSV-1 Antigen und einem okulären Antigen für die Erkrankung verantwortlich sei (53). In anderen Arbeiten wurde allerdings gefunden, dass HSV-1 auch in Abwesenheit autoreaktiver T-Zellen eine Keratitis verursachen kann (54). Die Anwesenheit des Virus im Auge reicht aus um Zytokinproduktion und daraus folgend chronische Inflammation zu induzieren. Die Antigenpezifität der infiltrierenden T-Zellen ist dabei nicht von Bedeutung.

Aus dem oben gesagten ergibt sich, dass eine von *B. burgdorferi* induzierte Immunpathologie nicht notwendigerweise antigenspezifisch im Sinne der molekularen Mimikry sein muß. Es ist vorstellbar, dass durch die Infektion mit *B. burgdorferi* ein proinflammatorisches Zytokinmilieu induziert wird, dass unabhängig von der Antigenpezifität der T-Zellen eine chronische Arthritis begünstigt (35, 44). Verschiedene Arbeitsgruppen, darunter unsere eigene (55), konnten nachweisen, dass die Borrelienspezifische T-Zellantwort vornehmlich eine Th1 Antwort ist. Wir haben untersucht, ob *B. burgdorferi* in der Lage ist in Th-Zellen, die nicht *B. burgdorferi* Antigene erkennen die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu induzieren (21, 56).

2.2.2 Identifizierung unterschiedlicher T-Helferzell Subpopulationen ex vivo

Abgesehen von ihrer Zytokinproduktion unterscheiden sich die Th-Subpopulationen auch in ihrer transienten Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren (57) und hinsichtlich des Gebrauches von Signaltransduktionswegen und Transkriptionsfaktoren (46). Zur genaueren *in vivo* Analyse der unterschiedlichen Th-Subpopulationen braucht man stabile „Marker“, die an der Oberfläche der Th1- oder Th2- Zellen exprimiert werden und auf lebenden Zellen detektierbar sind. Von entscheidender Bedeutung für das bessere Verständnis der Funktion von Th-Subpopulationen in Infektion, Autoimmunität und Allergie wäre darüber hinaus die Möglichkeit, die Funktion dieser Zellen mittels eines solchen Oberflächenmoleküls spezifisch modulieren zu können. Zwei Arbeitsgruppen, darunter unsere eigene, haben in den letzten beiden Jahren ein Oberflächenmolekül, das präferentiell auf Th2 Zellen exprimiert wird und von Bedeutung für die Funktion dieser Zellen ist, identifiziert und charakterisiert (50, 58-61).

2.2.3 Ko-Expression verschiedener Zytokine in vivo

Die meisten bislang publizierten Untersuchungen über die Zytokinexpression von Th-Zellen wurden an Th-Zellpopulationen und nicht an individuellen Zellen durchgeführt. An Zellpopulationen kann aber nicht untersucht werden, ob einzelne Zellen bestimmte Zytokine z.B. die für Th2-Zellen charakteristischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 koordiniert „en bloc“ exprimieren, oder ob jede einzelne Zelle innerhalb einer Population eine individuelle

Kombination von Zytokinen exprimiert, z.B. auch „Typ 1-Zytokine“ wie IFN- γ gleichzeitig mit „Typ 2-Zytokinen“ wie IL-5. Die Untersuchungen, die bislang zur Zytokinproduktion einzelner Th-Zellen durchgeführt wurden, konnten teilweise nur wenige Zellen analysieren (62, 63). In einigen Untersuchungen, wurden große Zahlen individueller Th-Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Die meisten dieser Studien wurden an *in vitro* generierten Th1 oder Th2 Zellen durchgeführt (64-68). Diese Studien kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, das Th-Zellen in den frühen Stadien der *in vitro* Differenzierung Typ1 und Typ2 Zytokine ko-exprimieren können. *In vivo* konnte die Koexpression verschiedener Zytokine lange Zeit nicht analysiert werden. Das lag zum einen an der methodischen Schwierigkeit ausreichend antigenspezifische Th-Zellen zur Analyse aus einer normalen Maus zu gewinnen, zum anderen wirkte sich der Mangel an zuverlässigen Markern für die Th-Subpopulationen hinderlich aus. In den Mausmodellen der *Schistosoma mansoni*- und der *Nippostrongylus brasiliensis*- Infektion haben wir die Zytokinkoexpression von T1/ST2⁺/CD4⁺ und T1/ST2⁻ CD4⁺ Th Zellen *ex vivo* analysiert ((50) und Bonhagen & Kamradt, unveröffentlichte Beobachtungen). Im Abschnitt 3.2.2 wird dargestellt, dass sich die Zytokin-Koexpression von Th-Zellen *in vivo* vielfach nicht ohne weiteres als „Th1“ oder „Th2“ klassifizieren läßt.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung von Th-Zellen bei Infektion und Autoimmunität

3.1.1 Lyme Arthritis

3.1.1.1 B. Lengl-Janßen, et al., *J. Exp. Med.* 180, 2069-2078 (1994).

Die Hypothese, derzufolge die Th-Zellantwort auf *B. burgdorferi* zur Pathogenese der therapieresistenten Verlaufsform der Lyme Arthritis beiträgt, macht die überprüfbare Voraussage, dass Patienten mit einer akuten, durch Antibiotika heilbaren Lyme Arthritis und Patienten mit einer therapieresistenten Lyme-Arthritis unterschiedliche Th-Zellantwort auf *B. burgdorferi* ausbilden. In der im folgenden abgedruckten Arbeit (69) prüften wir diese Hypothese. Dazu wurden 313 verschiedene *B. burgdorferi*-spezifische T-Helferzelllinien aus dem Blut oder der Synovialflüssigkeit von 5 Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis und 4 Patienten mit akuter Lyme-Arthritis angelegt. 87 T-Zelllinien von Patienten mit akuter Lyme Arthritis und 112 T-Zelllinien von Patienten mit therapieresistenter Lyme Arthritis wurden auf die Erkennung von fünf verschiedenen rekombinanten *B. burgdorferi*-Proteinen geprüft. Drei der untersuchten Antigene (OspC, p39 und p93) wurden jeweils nur von einem geringen Prozentsatz der untersuchten TZL erkannt. Ein weiteres der *B. burgdorferi*-Antigene, outer surface Protein B (OspB) sehr häufig von den untersuchten TZL beider Patientengruppen erkannt: 40% der TZL von Patienten mit akuter Lyme Arthritis und 53% der TZL von Patienten mit therapieresistenter Lyme Arthritis erkannten OspB. Ein entscheidender Unterschied ergab sich für die Erkennung des fünften *B. burgdorferi*-Antigens, outer surface Protein A (OspA). Sechs Prozent der TZL von Patienten mit akuter Lyme-Arthritis erkannten OspA. Im Gegensatz dazu erkannten 60% der TZL von Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis OspA. Dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant (odds ratio 28,4; 95% Konfidenzintervall 9,2 – 87,8; $p < 0.005$). Dieser Befund ist gut mit der Hypothese einer unterschiedlichen T-Zellantwort auf *B. burgdorferi* in den beiden Patientengruppen zu vereinbaren.

3.1.1.2 T. Kamradt, et al., *Infect. Immun.* 64, 1284-1289 (1996).

Der oben dargestellte Befund: kein Unterschied in der Erkennung von OspB, aber signifikante Unterschiede in der Erkennung von OspA im Vergleich der beiden Patientengruppen, war umso erstaunlicher, als OspA und OspB eine hohe Sequenzhomologie aufweisen: 56% Sequenzidentität mit Abschnitten von bis zu 13 identischen Aminosäuren. Die dominante Erkennung eines möglicherweise arthritogenen OspA-Epitopes ist ein Pathomechanismus, der zur therapieresistenten Lyme-Arthritis führen könnte. Ausgehend von diesen Vorbefunden stellten wir die Hypothese auf, dass die TZL von Patienten mit therapieresistenter Lyme Arthritis eines oder wenige OspA-Epitope dominant erkennen und dass diese immundominanten OspA-Epitope möglicherweise einem Selbstantigen so sehr ähneln, dass die für dieses Epitop spezifischen Th-Zellen auch ein Selbstantigen erkennen können. Der erste Schritt diese Hypothese zu testen bestand darin, die OspA-Epitope, die von 31 OspA-spezifischen T-Zelllinien und 5 OspA-spezifischen T-Zellklonen von drei verschiedenen Patienten mit therapieresistenter Lyme Arthritis erkannt wurden, zu bestimmen. Dies haben wir in der im folgenden abgedruckten Arbeit unternommen. Dazu wurden die T-Zellen mit einem Set von 35 synthetischen Peptiden auf die Erkennung von OspA-Epitopen überprüft. Bei den Peptiden handelte es sich um 20mere, die jeweils um 10 Aminosäuren überlappten (z.B. 24-43, 34-53, 44-63 etc.) und die gesamte Sequenz des natürlich vorkommenden OspAs (OspA₁₇₋₃₇₃, die ersten 16 Aminosäuren der 373 Aminosäuren umfassenden OspA-Sequenz sind das Signalpeptid, das nicht mit untersucht wurde) umfaßten. Jeder der drei Patienten hatte ein individuelles Muster von erkannten OspA-Epitopen. Allerdings gab es auch klar erkennbare Gemeinsamkeiten. In jedem Fall wurde mindestens ein C-terminales OspA-Epitop (OspA₂₁₄₋₂₃₃, oder OspA₂₄₄₋₂₆₃) dominant erkannt. Darüber hinaus war das Epitop OspA₈₄₋₁₁₃ als immundominant für die untersuchten T-Zelllinien und Klone aller drei Patienten.

3.1.1.3 B. Maier, et al., *Eur. J. Immunol.* 30, 448-457 (2000)

Ziel der im folgenden abgedruckten Arbeit war es, Selbstantigene zu finden, die von kreuzreaktiven OspA-spezifischen Th-Zellen erkannt werden. Dabei sollten keinerlei Vorannahmen (z.B. Sequenzhomologie) gemacht werden. Da die therapieresistente Verlaufsform der Lyme-Arthritis gehäuft bei HLA-DR4 positiven Patienten auftritt (38) reduzierten wir unsere Untersuchungen auf HLA-DR4 restringierte T-Zellen. Da humane T-Zelllinien und T-Zellklone *in vitro* eine begrenzte Lebensdauer haben und auch nicht auszuschließen ist, dass durch monatelange *in vitro* Kultur bestimmte Klone, die möglicherweise nicht repräsentativ für das T-Zellrepertoire *in vivo* sind, präferentiell expandiert werden, nutzten wir für diese Studien ein „humanisiertes“ transgenes Mausmodell. Die von uns eingesetzten Mäuse sind transgen für HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401 (im folgenden „DR4“). Darüber hinaus sind diese Mäuse transgen für das humane CD4 (70). Diese Mäuse exprimieren keine murinen MHC-Klasse II Moleküle. Es ist wichtig, die Expression des murinen MHC-II „auszuschalten“, da nur dann gewährleistet ist, dass die untersuchten T-Zellen wirklich HLA-DR4 restringiert sind. In verschiedenen vergleichenden Untersuchungen hat sich gezeigt, dass HLA-transgene Mäuse ein geeignetes Modellsystem sind um die menschliche Immunantwort zu studieren, d.h. die in den Mäusen erhobenen Befunde waren im Menschen reproduzierbar (Übersichten in (13, 71)). Wir immunisierten die DR4 transgenen Mäuse mit *B. burgdorferi* OspA und gewannen aus verschiedenen Fusionen insgesamt 982 OspA-spezifische T-Zell Hybridome. Diese Hybridome wurden zunächst dazu genutzt um mit überlappenden Peptiden, gefolgt von Trunktationsanalysen vier immundominante Epitope zu definieren. Zwei dieser Epitope wurden auf Kreuzreaktivität untersucht. Dabei setzten wir eine neue Strategie ein, die keinerlei Vorannahmen über die Sequenz möglicher „Mimikry-Peptide“ benötigt: Die Epitope von jeweils 12 Aminosäuren Länge wurden einer kompletten „Substitutionsanalyse“ unterzogen. Das bedeutet, dass jede einzelne Aminosäure eines Epitopes durch jede einzelne der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt wurde. Mit den resultierenden 240 Peptiden 14 OspA-spezifische T-Zell Hybridome getestet. Der Einsatz einer so großen Zahl von Peptiden wurde möglich durch eine von unseren Kollaborationspartnern entwickelte Technik der Peptidsynthese auf Zellulose-Filtern (Übersicht in (72)). Durch die Substitutionsanalyse konnten wir für jedes der untersuchten T-Zell Hybridome ein individuelles „Supertop“ definieren, d.h. exakt festlegen, welche Aminosäuresubstitutionen an welchen Positionen des Peptides „erlaubt“ waren, d.h. die T-Zellaktivierung nicht beeinträchtigten, und welche Substitutionen zum Verlust der T-Zellaktivierung führten (s. Fig. 2 und Tab. 1 der nachfolgend abgedruckten Arbeit).

Diese individuellen Supertope wurden zur Datenbanksuche verwendet. Es wurde nach murinen oder humanen Peptiden gesucht, die die strukturellen Bedingungen der jeweiligen Supertope erfüllten. Insgesamt wurden so 856 Peptide identifiziert und auf Erkennung durch die T-Zell Hybridome getestet. 28 der 856 Peptide induzierten eine IL-2 Produktion, die derjenigen, die mit dem jeweiligen OspA-Epitope erzielten IL-2 Produktion ähnelte. Insgesamt zeigte diese Arbeit also ein bislang noch nicht demonstriertes Ausmaß an Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen und Selbstpeptiden.

3.1.2 Experimentell autoimmune Enzephalitis

3.1.2.1 J. L. Grogan, et al., *J. Immunol.* 163, 3764-3770 (1999)

In den oben beschriebenen Arbeiten sind wir von einem definierten bakteriellen Antigen (*B. burgdorferi* OspA) ausgegangen und haben nach kreuzreaktiven Selbst-Antigenen gesucht. Komplementär dazu haben wir in der nachfolgend abgedruckten Arbeit nach mikrobiellen oder viralen Peptiden, die von enzephalitogenen MBP-spezifischen T-Zellen erkannt werden, gesucht. In Mäusen mit dem MHC-Klasse II Haplotyp H-2^u kann eine experimentell autoimmune Enzephalitis (EAE) induziert werden. Die enzephalitogenen T-Zellen erkennen die N-terminalen 11 Aminosäuren des murinen MBP (MBP_{Ac1-11}) (41). Für unsere Untersuchungen setzten wir Mäuse ein, die transgen für einen MBP_{Ac1-11}-spezifischen T-Zellrezeptor sind (8). Um experimentelle Einflüsse anderer, nicht MBP_{Ac1-11}-spezifischer T-Zellrezeptoren auszuschließen, verwendeten wir TZR-transgene Mäuse, die mit Mäusen gekreuzt wurden, die keine endogenen $\alpha\beta$ T-Zellen produzieren (TCR $C\alpha^{-/-}$ Mäuse) (42). Deshalb haben die von uns verwendeten Mäuse keine anderen $\alpha\beta$ T-Zellen außer den transgenen T-Zellen. Diese Mäuse werden im weiteren als T⁺ α^{-} Mäuse bezeichnet.

Analog zu unseren zuvor beschriebenen Arbeiten (73) haben wir mit einer Substitutionsanalyse des MBP_{Ac1-11} Epitopes begonnen. Das so definierte „Supertop“ haben wir als Motiv für eine Datenbanksuche verwendet. Diese Suche ergab 832 mikrobielle Peptide, die den strukturellen Kriterien des Supertopes entsprachen. Alle diese Peptide wurden auf Erkennung durch die MBP_{Ac1-11}-spezifischen T-Zellen geprüft und 61 der 832 aktivierten die T-Zellen ähnlich gut wie das MBP_{Ac1-11} Peptid. Zwei dieser 61 mikrobiellen Peptide wurden nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* getestet. Immunisierung mit diesen Peptiden induzierte EAE mit der gleichen Kinetik und dem gleichen klinischen Schweregrad wie Immunisierung mit dem MBP-Peptid. Es folgt, dass bakterielle Peptide mit relativ geringer Sequenzhomologie zum Selbstpeptid (MBP_{Ac1-11}), in der Lage sind eine autoimmune Enzephalitis zu induzieren.

3.2 Differenzierung von Th Zellen bei Infektion und Autoimmunität

3.2.1 Lyme Arthritis

3.2.1.1 C. Infante-Duarte, T. Kamradt, *Infect. Immun.* 65, 4094-4099 (1997).

In der nachfolgend abgedruckten Arbeit haben wir untersucht, ob *B. burgdorferi* in der Lage ist bei Th-Zellen, die nicht *B. burgdorferi* Antigene erkennen die Entwicklung eines proinflammatorischen Th1 Phänotypes zu induzieren. Zur Beantwortung dieser Frage haben wir T-Zellrezeptor transgene Th Zellen untersucht. Dieses System bietet die folgenden Vorteile: 1) TZR-transgene T-Zellen können ohne vorherige *in vivo*-Immunisierung, *in vitro* aktiviert werden. 2) Durch Zugabe der geeigneten Zytokine (vgl. **Abb. 2**) kann wahlweise die Entwicklung eines Th1 oder eines Th2 Phänotypes induziert werden. Die von uns untersuchten Th Zellen waren transgen für einen TZR, der ein Ovalbuminpeptid gebunden an H-2^d erkennt (74). Wir konnten zeigen, dass *B. burgdorferi* die Entwicklung eines Th1-Phänotypes in den ovalbuminspezifischen Th Zellen, die keine *B. burgdorferi* Antigene kreuzreaktiv erkannten, induzierte. Synthetische Lipopeptide, abgeleitet von der Sequenz des *B. burgdorferi* OspA oder OspB, waren ebenso wie Lysate von *B. burgdorferi* in der Lage die Th1 Phänotypentwicklung zu induzieren. Neutralisierende Antikörper gegen IL-12 verhinderten teilweise, aber nicht vollständig, die durch *B. burgdorferi* induzierte Th1-Phänotypentwicklung. Insgesamt wurde mit dieser Arbeit also gezeigt, dass *B. burgdorferi* vermittels seiner Lipoproteine in der Lage ist, auch solche Th-Zellen, die für andere Antigene als *B. burgdorferi* spezifisch sind, zur Produktion von IFN- γ anzuregen. Diese von *B. burgdorferi* antigenunspezifisch induzierte IFN- γ Produktion könnte wesentlich zum Erhalt chronischer Entzündungen, wie z.B. der therapieresistenten Lyme Arthritis, beitragen.

3.2.2 Detektion und Modulation der Th-Differenzierung *in vivo*

3.2.2.1 M. Löhning, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6930-6935 (1998)

Abgesehen von ihrer Zytokinproduktion unterscheiden sich die Th-Subpopulationen auch in ihrer transienten Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren (57) und hinsichtlich des Gebrauches von Signaltransduktionswegen und Transkriptionsfaktoren (46). Zur genaueren *in vivo* Analyse der unterschiedlichen Th-Subpopulationen braucht man stabile „Marker“, die an der Oberfläche der Th1- oder Th2- Zellen exprimiert werden. Die mit uns kooperierende Arbeitsgruppe um Doug Levinson (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, U.S.A.) hat versucht Moleküle, die spezifisch von Th1 oder Th2 Zellen exprimiert werden, zu identifizieren. Dazu wurden DO11.10 TZR transgene T-Zellen *in vitro* zu Th1 oder Th2 Zellen differenziert wie oben beschrieben (21). Anschließend wurde eine representational difference analysis (RDA) durchgeführt. Eine cDNA, die in Th2, nicht aber Th1 Zellen gefunden wurde, wurde weiter analysiert. Dieselbe cDNA war schon 1989 von zwei verschiedenen Gruppen aus Fibroblasten kloniert worden und als T1 (75) oder ST2 (76) bezeichnet worden. Im folgenden bezeichnen wir das Protein als T1/ST2. T1/ST2 ist ein Orphan-Rezeptor, der dem IL-1 Rezeptor (Typ1) ähnelt (ca. 25% Sequenzhomologie) (76). Dennoch bindet T1/ST2 weder IL-1 α , noch IL-1 β oder IL-1RA und sein natürlicher Ligand ist derzeit noch unbekannt (77).

3.2.2.2 M. Löhning, et al., *J. Immunol.* 162, 3882-3889 (1999)

Unsere Untersuchung (59) hatte gezeigt, dass T1/ST2 *in vitro* und *ex vivo* präferentiell auf Th2 Zellen exprimiert wird. Darauf aufbauend untersuchten wir als nächstes die Korrelation der T1/ST2 Expression mit Th2-Immunantworten *in vivo*. Als Modell wählten wir die Immunantwort auf *Schistosoma mansoni*. Dieses Modell ist deshalb geeignet, weil die murine Immunantwort auf Schistosomen eine „gemischte“ Th1/Th2 Immunantwort mit deutlichem Überwiegen der Th2 Komponente ist. Wir haben dieses Modell weiterhin dazu genutzt um die Plastizität der Th2-Differenzierung *in vivo* zu untersuchen.

Der erste wesentliche Befund dieser Arbeit ist, dass T1/ST2 auch *in vivo* präferentiell auf Th2-Zellen exprimiert wird. Wie wir gezeigt haben, ko-lokalisiert die T1/ST2-Expression auf Th-Zellen mit der Th2 Immunantwort *in vivo*. Der zweite wesentliche Befund betrifft die Koexpression von Typ 1 und Typ 2 Zytokinen. Mit durchflußzytometrischen Untersuchungen der Zytokinproduktion individueller Th-Zellen haben wir gezeigt, dass Th Zellen in unterschiedlichem Ausmaß auf die Produktion von Typ 1 oder Typ 2 Zytokinen „festgelegt“ sein können. Die Frage bei solchen Koexpressions-Analysen ist, ob zwei untersuchte Parameter stochastisch oder koordiniert miteinander koexprimiert werden. Wir fanden, dass unterschiedliche Populationen von Th-Zellen unterschiedlich flexible Programme der Zytokinexpression haben. Th-Zellen, die nur ein Typ 1 oder Typ 2 Zytokin exprimieren, exprimieren häufig auch „gegensätzliche“ Zytokine (also Typ 1 und Typ 2 gleichzeitig). Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Koexpression von Typ 1 und Typ 2 Zytokinen wird durch zwei Ereignisse drastisch gemindert: 1) die Koexpression zweier Typ 2 Zytokine macht die gleichzeitige Expression eines Typ 1 Zytokines in der betreffenden Zelle unwahrscheinlicher und *vice versa* für die Koexpression zweier Typ 1 Zytokine. 2) Die Expression von T1/ST2 auf der Zelloberfläche verringert ebenfalls die Wahrscheinlichkeit der Koexpression von Typ 1 und Typ 2 Zytokinen. Die Expression von T1/ST2 zeigt also eine fortgeschrittene „Festlegung“ der betreffenden Th-Zelle auf einen Th2 Phänotyp an.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung von Th-Zellen bei Infektion und Autoimmunität: Molekulare Mimikry als Ursache für Autoimmunität?

Ausgangspunkt unserer Arbeiten zur Bedeutung der molekularen Mimikry für die Pathogenese der therapieresistenten Lyme-Arthritis waren verschiedene experimentelle, klinische und epidemiologische Daten, die die Vermutung nahelegten, dass die Immunantwort des Wirtes auf *B. burgdorferi* an der Pathogenese der therapieresistenten Lyme Arthritis beteiligt sein könnte. Unsere Hypothese war, dass *B. burgdorferi*-spezifische T-Zellen genetisch prädisponierter Patienten durch Kreuzerkennung eines Selbst-Antigens arthritogen werden könnten. Wir haben zunächst festgestellt, dass T-Zelllinien von Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis, nicht jedoch T-Zelllinien von Patienten mit akuter Lyme Arthritis, häufig ein bestimmtes Borrelien-Antigen erkennen: outer surface protein A (OspA) (69). Darauf aufbauend haben wir die OspA-Epitope, die von OspA-spezifischen T-Zellen von Patienten mit therapieresistenter Lyme-Arthritis erkannt werden, definiert und in öffentlich zugänglichen Protein-Datenbanken nach Selbst-Antigenen, die eine hohe Sequenzhomologie mit einem der gefundenen Epitope aufweisen, untersucht. Dabei fanden wir keine „vielversprechenden“ Selbstantigene (78).

Zum Zeitpunkt der zitierten Untersuchungen (69, 78) galt die Antigenerkennung durch T-Zellrezeptoren als äußerst spezifisch. Es galt als sicher, dass allenfalls minimale, konservative Änderungen der spezifischen Peptidsequenz „erlaubt“ sein dürften um die Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor nicht zu zerstören (79). Bei der Suche nach Kreuzreaktivität wurde also nach möglichst ausgeprägter Sequenzhomologie oder, besser, Sequenzidentität, zweier Peptide gesucht (7, 29, 80). Diese Vorgehensweise ist in der folgenden **Abb. 3.** schematisch dargestellt.

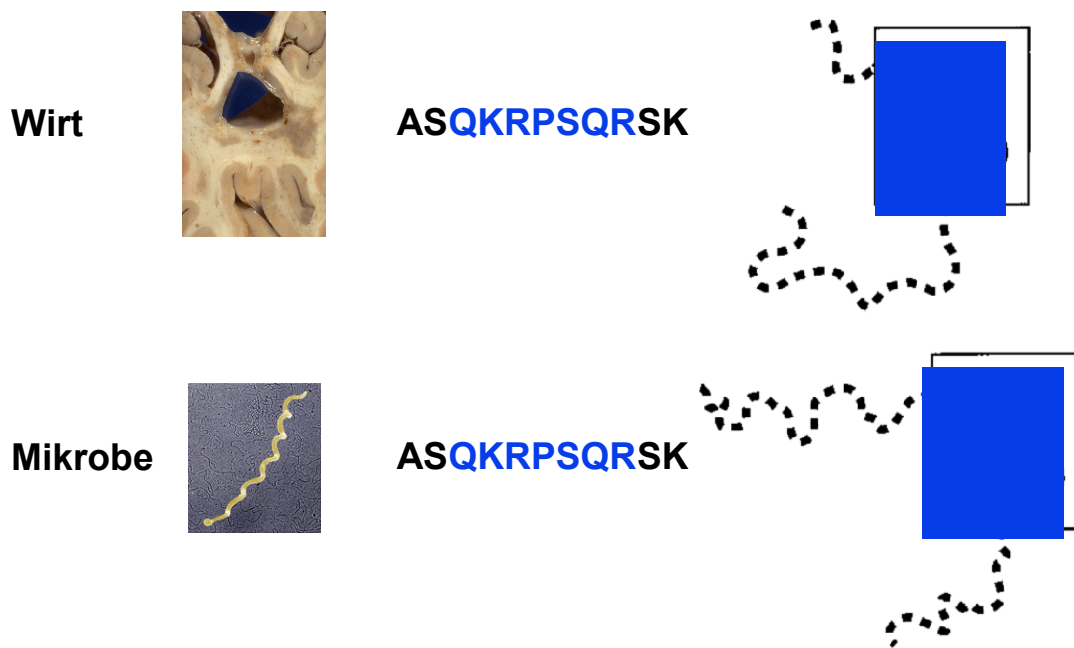


Abb. 3 Molekulare Mimikry: Kreuzreaktivität durch Sequenzhomologie? Die herkömmliche Vorgehensweise sucht nach möglichst großen Abschnitten von Sequenzidentität oder Sequenzhomologie zwischen einem Selbstprotein (hier beispielhaft dargestellt eine Sequenz aus dem basischen Myelinprotein, dem Zielantigen autoaggressiver Th-Zellen bei der multiplen Sklerose) und einem mikrobiellen Protein.

Seit Mitte der 1990er Jahre häuften sich aber die Hinweise aus verschiedenen experimentellen Ansätzen, dass die Antigenerkennung durch T-Zellrezeptoren möglicherweise doch weitaus flexibler ist, als bis dahin angenommen (Übersicht in (81)). Zusammenfassend seien die folgenden wesentlichen Punkte genannt:

1) Allen und Mitarbeiter entdeckten, dass T-Zellaktivierung nicht nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ erfolgt. Bestimmte Veränderungen in der Aminosäuresequenz eines antigenen Peptides können zum Verlust einiger Aktivierungsparameter (z.B. T-Zellproliferation) bei gleichzeitiger Erhaltung anderer Aktivierungsparameter (z.B. Zytokinproduktion). Die Peptid/MHC Liganden des T-Zellrezeptors lassen sich also in Agonisten, partielle Agonisten und Antagonisten einteilen (Übersicht in(82)).

2) Die Analyse einzelner T-Zellklone zeigte, dass bestimmte Aminosäuren des antigenen Peptides essentiell für die Erkennung durch den TZR oder die Bindung an das antigenpräsentierende MHC Molekül sind. An diesen Positionen waren wenige oder gar keine Substitutionen möglich. An anderen Positionen, die anscheinend weniger essentiell für die Antigenerkennung sind, waren verschiedene Substitutionen möglich (z.B. (83))

3) Experimente mit transgenen Mäusen zeigten, dass ein funktionsfähiges T-Zellrepertoire auch dann selektioniert werden kann, wenn im Thymus nur ein einziges Peptid präsentiert wird (84).

4) Strukturelle Analysen der trimolekularen Peptid/MHC-TZR Interaktion demonstrierten ebenfalls die Möglichkeit, dass ein einzelner TZR mit verschiedenen p/MHC interagieren kann (Übersicht in (85)).

Diese Befunde liessen es sinnvoll erscheinen, die Hypothese der molekularen Mimikry mit neuen Methoden zu untersuchen. Offenkundig ist die Suche nach Sequenzhomologien nicht optimal geeignet um kreuzreaktive Peptide zu identifizieren. Wir entwickelten eine alternative Strategie, indem wir für OspA-spezifische Th-Zellen „Supertope“ bestimmten, die wir zur Suche nach kreuzreaktiven Liganden einsetzten (73). Darüber hinaus setzten wir diese Methode im EAE-Modell dazu ein mikrobielle Liganden, die von einem autoreaktiven TZR erkannt werden, zu definieren (86).

Die beiden wesentlichen Erkenntnisse aus unserer systematischen Analyse der Kreuzreaktivität von Th-Zellen lauten:

- 1) Strukturelle Kriterien und nicht Sequenzhomologie der potenziell erkannten Peptide sind entscheidend für die Kreuzreaktivität von T-Zellen.
- 2) Kreuzreaktivität von Th-Zellen ist häufig.

4.1.1 Strukturelle Kriterien und nicht Sequenzhomologie der potenzielle erkannten Peptide sind entscheidend für die Kreuzreaktivität von T-Zellen.

Wir haben in zwei verschiedenen Systemen: OspA/HLA-DR4 und MBP_{Ac1-11}/I-A^u eine Vielzahl kreuzreaktiver Peptide identifizieren können, die allenfalls nur sehr geringe Sequenzhomologien zum jeweiligen „Originalpeptid“ aufwiesen (73, 86). Einige der Selbstpeptide, die von OspA-spezifischen T-Zellen erkannt wurden, hatten nicht eine einzige Aminosäure aus dem OspA Peptid konserviert. Keines dieser Peptide wäre in einer Suche nach Sequenzhomologien identifiziert worden. Im MBP-Modell identifizierten wir 6 Peptide, die nur zwei Aminosäuren aus dem MBP_{Ac1-11} Peptid konserviert hatten. In diesem Modell korrelierte die Zahl der konservierten Aminosäuren nicht mit der Agonisten-Funktion der jeweiligen Peptide. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu der herrkömmlichen Auffassung, dass T-Zellrezeptoren „ihr“ Antigen mit einer exquisiten Spezifität erkennen. Unsere Befunde passen stattdessen zu einer ganzen Reihe ähnlicher in den letzten Jahren publizierter Befunde. Die Aufklärung der Kristallstrukturen muriner und humaner MHC Moleküle (87-89), sowie die biochemische Analyse der Selbstpeptide, die physiologischerweise an MHC-Moleküle gebunden sind (90, 91) erlaubten die Definition von „Bindungsmotiven“ welche die Bindung von Peptiden an bestimmte MHC-Moleküle begünstigen (Übersicht in (92)). Davis und Mitarbeiter waren die ersten, die diese Erkenntnisse nutzten und ein antigenes Peptid, das von einem transgenen T-Zellrezeptor erkannt wird, systematisch veränderten mit dem Ziel diejenigen Positionen, die entweder für die Peptidbindung an das präsentierende MHC-Molekül, oder für die Bindung an den T-Zellrezeptor kritisch sind, zu identifizieren (93). Wucherpfennig und Strominger waren die

ersten, die einen ähnlichen Ansatz auf die Analyse der molekularen Mimikry übertrugen: zunächst bestimmten sie für einige HLA-DR2 restringierte MBP-spezifische T-Zellklone diejenigen Positionen des Peptides, die entweder für die Bindung an HLA-DR2 oder die Erkennung durch den T-Zellrezeptor von Bedeutung waren. In der nachfolgenden Datenbanksuche erlaubten sie Aminosäuresubstitutionen ausschließlich an den „unwichtigen“ Positionen. Von 129 mikrobiellen Peptiden, die auf diese Weise identifiziert wurden, waren 7 in der Lage zumindest jeweils einen der 5 untersuchten T-Zellklone zu aktivieren. Nur eines der 7 gefundenen Peptide wäre auch durch eine Suche nach Sequenzhomologie identifiziert worden (83).

Sowohl bei den Ergebnissen von Wucherpfennig und Strominger (83) als auch bei unseren eigenen Ergebnissen (73, 86) fällt auf, dass die Zahl der „vorhergesagten“ Peptide die Zahl derjenigen Peptide, die wirklich die untersuchten T-Zellen aktivieren, um ein Vielfaches übertrifft. Unsere Untersuchungen an den OspA-spezifischen T-Zellhybridomen liefern eine Erklärung dafür. 387 Selbstantigene entsprachen dem Supertop für mindestens eines der 7 untersuchten OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome. 469 Selbstantigene entsprachen dem Supertop für mindestens eines der 7 untersuchten OspA₂₃₅₋₂₄₆-spezifischen Hybridome. Erkannt wurden aber nur 13 bzw. 15 Peptide. Betrachtet man die Peptide, die tatsächlich in der Lage waren die T-Zellen zu aktivieren, so stellt man fest, daß z.B. ein Peptid, das dem Supertop eines bestimmten Hybridoms entsprach, zwar nicht von diesem, wohl aber von einem anderen Hybridom erkannt wurde. Die naheliegendste Erklärung für dieses Phänomen ist, dass zwei individuell „verbotene“ Substitutionen in Kombination erlaubt sein können, d.h. die Antigenerkennung durch den T-Zellrezeptor rekonstituieren. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass wir vergleichend zu unserer Supertopanalyse auch eine konventionelle Suche nach Sequenzhomologien durchgeführt haben. Diese Suche brachte 88 „Kandidatenpeptide“ für OspA₁₆₄₋₁₇₅ und 63 „Kandidatenpeptide“ für OspA₂₃₅₋₂₄₆. Keines der 63 Peptide, die Sequenzhomologie zum OspA₂₃₅₋₂₄₆ aufwiesen, konnte die OspA₂₃₅₋₂₄₆ – spezifischen T-Zellen aktivieren. Im Gegensatz dazu waren unter den 63 OspA₁₆₄₋₁₇₅ Homologen 3 Peptide, die, obwohl sie keinem der von uns definierten Supertope entsprachen, in der Lage waren mindestens eines der OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome zu aktivieren. Auch bei diesen Peptiden stellte sich also eine Kombination individuell nicht erkannter Substitutionen als T-Zell-aktivierend heraus. Im Umkehrschluß ist es einsichtig, dass Kombinationen individuell „erlaubter“ Aminosäuresubstitutionen ein Peptid ergeben können, das vom T-Zellrezeptor nicht mehr erkannt wird.

Hinweise auf solche „kombinatorischen Effekte“ kommen auch von zwei anderen Arbeitsgruppen: Reay et al. hatten nach Definition der MHC- und TZR-Kontaktresiduen eines antigenen Peptides gefunden, dass auch Aminosäuresubstitutionen in den „unwichtigen“ Abschnitten des Peptides, an Positionen also, die scheinbar weder an MHC, noch an den TZR binden, dramatische Auswirkungen auf die Erkennung des Peptides durch den untersuchten T-Zellrezeptor haben konnten (93). Die Arbeitsgruppe um Martin und Houghten hat in den letzten Jahren randomisierter Peptidbibliotheken eingesetzt um die Kreuzreaktivität von T-Zellen systematisch zu untersuchen (Übersicht in (94)). Auch diese Arbeitsgruppe findet Mimikry-Peptide, die keine einzige Aminosäure mit dem Originalpeptid gemeinsam haben. Weiterhin konnten sie mit ihrer Methode ebenfalls zeigen, dass eine Aminosäuresubstitution,

die für sich genommen die Antigenerkennung zerstört, durch eine benachbarte „positive“ Substitution ausgeglichen werden kann (95).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass aus den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, darunter unserer eigenen, in den letzten Jahren klargeworden ist, dass T-Zellen Antigen weitaus flexibler erkennen als bislang angenommen. Die Kreuzreaktivität läßt sich nicht durch Kenntnis der Aminosäuresequenz eines Peptides vorhersagen, sondern beruht auf strukturellen Charakteristika. Allerdings ist es derzeit weder mit der von uns eingesetzten Technik der Substitutionsanalyse, noch mit den von der Arbeitsgruppe um Martin und Houghten eingesetzten Peptidbibliotheken möglich, aus einer Liste von „Kandidatenpeptiden“ korrekt zu prognostizieren, welche die untersuchten T-Zellen wirklich aktivieren. Die Entwicklung von Algorithmen, die dies vielleicht doch ermöglichen können ist derzeit Gegenstand intensiver Bemühungen in verschiedenen Labors.

4.1.2 Kreuzreaktivität von Th-Zellen ist häufig....

Der zweite wesentliche Befund aus unseren Arbeiten zur molekularen Mimikry ist, dass Kreuzreaktivität von Th-Zellen häufig ist. Dies steht im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, nach der die Kreuzreaktivität von T-Zellen ein seltenes Ereignis ist. Aus dem vorangegangenen Abschnitt geht hervor, dass unsere Methode der Substitutionsanalyse die Zahl der von einem T-Zellrezeptor erkannten Peptide mit Sicherheit unterschätzt. Bei Anlegen strengster Kriterien („Stimulationsindex“ > 50) haben wir für einen autoreaktiven T-Zellrezeptor 61 kreuzreaktive mikrobielle Peptide (86) und 36 kreuzreaktive Selbstpeptide (unveröffentlicht) identifiziert. Ähnliche Daten haben wir für die OspA-spezifischen T-Zellen erhoben (73). Die Daten, die von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen experimentellen Systemen erhoben worden sind, unterstützen unsere Befunde. So kann in der Maus ein einziges im Thymus präsentiertes Peptid ein funktionsfähiges T-Zellrepertoire selektionieren (96). Auch mit anderen als den von uns eingesetzten Methoden kann für autoreaktive T-Zellrezeptoren eine Vielzahl von mikrobiellen Liganden identifiziert werden (95). Unlängst wurde sogar eine Untersuchung veröffentlicht, die darauf schließen läßt, das ein einziger T-Zellklon zumindest einige hundert verschiedene Peptide erkennen kann (97)

4.1.3 ... aber zumeist ohne pathologische Konsequenzen

Die vielleicht wichtigste Konsequenz aus unseren Befunden ist, dass von einer auf Peptidebene definierten Kreuzreaktivität zwischen einem Selbstantigen und einem mikrobiellen Antigen keinesfalls auf einen pathogenetischen Zusammenhang geschlossen werden darf. Angesichts der Tatsache, dass die Kreuzerkennung von mikrobiellen und Selbstpeptiden eher die Regel als die Ausnahme darstellt, kann dem alleinigen Nachweis einer Kreuzreaktivität auf Peptidebene keine Relevanz zugemessen werden. In einigen Fällen konnte durch die Immunisierung mit dem mikrobiellen Mimikry-Peptid die untersuchte Autoimmunkrankheit induziert werden (86, 98). Dabei waren jedoch zumeist Inzidenz und Schweregrad der Erkrankung drastisch reduziert (99, 100) oder es waren zur Krankheitsinduktion im Vergleich zum Selbstpeptid erheblich höhere Mengen des mikrobiellen Peptides notwendig (101). Zur Induktion von Autoimmunität durch kreuzreaktive mikrobielle Peptide müssen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein, die *in vivo* offensichtlich in den seltensten Fällen gegeben sind (ausführliche Diskussion in (14, 73,

86)): die Peptide müssen aus von den antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und präsentiert werden, die Konzentrationen sowohl des mikrobiellen als auch des Selbstpeptides müssen hoch genug sein um potenziell autoreaktive T-Zellen zu aktivieren, es müssen hinreichend viele autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, diese müssen an den Ort gelangen, an dem das Selbstantigen physiologischerweise vorhanden ist, die „richtigen“, in den jeweiligen Umständen pathogenen Zytokine produzieren, und schließlich die immunologischen Regulationsmechanismen (Zelltod, Anergie, regulatorische Zellen) überwinden, die normalerweise das Auftreten von Autoimmunität verhindern. Es muß also eine Vielzahl von pathogenen Faktoren gleichzeitig zusammenkommen, damit molekulare Mimikry möglicherweise zur Induktion einer Autoimmunkrankheit führt.

4.1.4 „Bystander Aktivierung“?

Könnten antigen-unspezifische Pathomechanismen von der Infektion zur Autoimmunität führen? CD8⁺ Lymphozyten können durch IFN- α unabhängig von der Spezifität ihres TZRs aktiviert werden. In Mausmodellen wurde deshalb im Rahmen von Virusinfektionen eine massive Proliferation auch solcher CD8⁺ Lymphozyten beobachtet, die nicht für das jeweilige Virus spezifisch waren (16, 17). Beobachtungen im murinen Modell des Typ I Diabetes (102), sowie in zwei Enzephalitis-Modellen (15, 103) lassen vermuten, dass ähnliche Mechanismen auch bei CD4⁺ Th Zellen wirksam sein können. Auch die Tatsache, dass alleine die Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine oder das Fehlen anti-inflammatorischer Zytokine ausreichend sind um verschiedene Tiermodelle von Autoimmunität zu induzieren (51, 104, 105), spricht dafür, dass antigen-unspezifische Mechanismen zur Pathogenese von Autoimmunität nach Infektionskrankheiten beitragen können.

Der Befund, dass *B. burgdorferi* die Produktion von IFN- γ in Th-Zellen, die nicht spezifisch für ein *B. burgdorferi* Antigen sind drastisch verstärken kann (21) spricht dafür, dass auch *B. burgdorferi* Bystander Effekte ausüben kann, die eine chronische Entzündung und letztlich Autoimmunität begünstigen. In einer neueren Arbeit (56) haben wir diesen Befund weiter verfolgt. In Kollaboration mit „Genetics Institute“ in Cambridge, MA, U.S.A. haben wir die Induktion von 250 verschiedenen immunologisch relevanten mRNAs in Ovalbumin-spezifischen Th Zellen untersucht, die entweder durch Zugabe von IL-12 oder von *B. burgdorferi* zu „Th1“-Zellen differenziert worden waren. Es zeigte sich, dass die Expression einiger mRNAs nur durch *B. burgdorferi*, nicht aber durch IL-12 verstärkt wurde. Eine solche mRNA war die für IL-17 kodierende. Da über IL-17 bis dahin einerseits noch fast nichts bekannt war, IL-17 aber andererseits in verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis (106, 107) oder multiple Sklerose (108) vermehrt nachgewiesen werden konnte, haben wir die Expression und Regulation dieses Zytokines näher untersucht. Mit ELISA und durchflußzytometrischen Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass die Produktion von IL-17 in Th-Zellen von *B. burgdorferi* verstärkt wird. Dieser Befund ist nicht exklusiv für *B. burgdorferi*, Lysate von *M. tuberculosis* hatten einen vergleichbaren Effekt. Praktisch alle IL-17 produzierenden Th-Zellen produzierten gleichzeitig IFN- γ (56). Diese Daten, in Kombination mit der Tatsache, dass IL-17 in chronisch inflammatorischen Läsionen nachgewiesen werden kann (106, 108) legen die Vermutung nahe, dass *B. burgdorferi* antigenunspezifisch eine Population von Th-Zellen

induziert, die durch die Koexpression von IL-17 und TNF- α starke inflammatorische Kapazität hat.

Auch im EAE-Modell finden wir Hinweise auf „Bystander-Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen. Die Injektion von LPS kann in den T $^+$ α Mäusen EAE induzieren (unveröffentlichte Beobachtungen). Die genauen Mechanismen dieser EAE-Induktion werden zur Zeit noch untersucht.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass im Verlauf der letzten Jahre in verschiedenen Labors, darunter unserem eigenen, vermehrt Hinweise darauf gefunden wurden, dass Infektionserreger in der Lage sind die Immunantwort so zu modulieren, dass antigen-unspezifisch starke proinflammatorische Effekte entstehen, die durchaus am Zustandekommen von Autoimmunität beteiligt sein können.

4.1.5 Konsequenzen für die Molekulare Mimikry Hypothese

Was bedeuten die in den letzten Jahren erhobenen Daten über die Kreuzreaktivität von T-Zellen für die Molekulare Mimikry Hypothese? Zum einen ist klar geworden, dass die in der Abbildung 3 dieser Arbeit dargestellte konventionelle Vorgehensweise bei der Suche nach Kreuzreaktivitäten, die Datenbanksuche nach Sequenzhomologien, inadäquat ist. Zur Identifizierung der von einem T-Zellrezeptor erkannten Liganden müssen strukturelle Kriterien die Grundlage der Suche sein. Hier ergibt sich ein praktisches Problem durch die Tatsache, dass die derzeit verfügbaren Methoden, Substitutionsanalyse oder randomisierte Peptidbibliotheken für T-Zellklone, nicht aber für T-Zellpopulationen praktikabel sind. Bedingt durch die Tatsache, dass jeder einzelne der vielen verschiedenen Klone, die ein bestimmtes Peptid erkennen, sein individuelles Muster von Kreuzreaktivität hat, ergäbe die Untersuchung einer polyklonalen T-Zellpopulation mit einer dieser beiden Methoden, dass an jeder Position des Epitopes alle Aminosäuresubstitutionen erlaubt sind und damit ein sinnloses Ergebnis. Es ergibt sich, dass mit heutiger Technik das Ausmaß der Kreuzreaktivität einer polyklonalen T-Zellpopulation zwangsläufig immer unterschätzt wird. Entweder man sucht nach Sequenzhomologien. In diesem Fall kann man die Erkennung der gefundenen Peptide durch die polyklonale T-Zellpopulation testen, hat aber nur einen Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Kreuzreaktivitäten erfaßt. Oder man untersucht T-Zellklone mit einer der beiden moderneren Techniken (Substitutionsanalyse/Peptidbibliotheken). In diesem Fall kann man nur einen kleinen Bruchteil der antigenspezifischen Klone untersuchen. Ein Beispiel liefern unserer Untersuchungen an den OspA-spezifischen T-Zellen. Eine andere Arbeitsgruppe hat ebenso wie wir OspA₁₆₄₋₁₇₅ als immundominant für HLA-DR4 restringierte T-Zellen erkannt (109). In einer Sequenzhomologie-Suche fand diese Gruppe ein Epitop des humanen LFA-1 Moleküls, das eine starke Homologie mit dem OspA₁₆₄₋₁₇₅ Peptid aufweist. In verschiedenen *in vitro* assays wurden kreuzreaktive T-Zellen, die sowohl OspA₁₆₄₋₁₇₅ als auch das korrespondierende LFA-1 Peptid erkennen, nachgewiesen (109). Im Gegensatz dazu erkannte keines der von uns untersuchten 7 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome dieses Peptid (73). Diese Befunde illustrieren, die Tatsache, dass individuelle T-Zellklone unterschiedliche Muster von Kreuzreaktivität aufweisen. Die ideale Methode zum möglichst umfassenden Nachweis der individuellen Kreuzreaktivitäten innerhalb einer polyklonalen T-Zellpopulation ist also noch nicht entwickelt.

Angesichts der Tatsache, dass die Kreuzerkennung von mikrobiellen und Selbstpeptiden eher die Regel als die Ausnahme darstellt, ist es nicht verwunderlich, dass trotz der Plausibilität und der Attraktivität der Hypothese der molekularen Mimikry bislang noch niemals *in vivo* gezeigt werden konnte, dass molekulare Mimikry tatsächlich Autoimmunkrankheiten induziert. Selbstverständlich bleibt festzuhalten, dass weder unsere eigenen, noch andere bislang publizierte Arbeiten molekulare Mimikry als Pathomechanismus in der Genese von Autoimmunkrankheiten ausschließen.

Welche Rolle könnte der molekularen Mimikry in der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten zukommen? Mehrere Pathomechanismen, die molekulare Mimikry involvieren sind vorstellbar:

1) Rezidivierende oder chronische Infektionen könnten durch wiederholte oder kontinuierliche Stimulation und Expansion kreuzreaktiver T-Zellklone dazu beitragen, dass im Laufe von Jahren die Zahl der kreuzreaktiven T-Zellen, die sowohl das mikrobielle Antigen, als auch ein bestimmtes Selbstantigen erkennen, eine bestimmte kritische Schwelle überschreitet. Bei Vorhandensein von einer ausreichend hohen Anzahl autoreaktiver T-Zellen könnte Kreuzreaktivität schließlich die Entwicklung von Autoimmunität begünstigen. Die Suszeptibilität hierfür könnte genetisch determiniert sein. Zwei Mausstämmen, die MHC-identisch sind und beide das gleiche enzephalitogene Epitop eines ZNS-Autoantigenes erkennen, unterscheiden sich in ihrer Suszeptibilität für EAE. Während die Immunisierung mit dem Autoantigen im einen Stamm (SJL) EAE induziert, ist das im anderen Stamm (B10.S) nicht der Fall. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, dass SJL Mäuse im naiven Repertoire eine erheblich höhere Zahl von Th-Zellen, die das Autoantigen erkennen, haben (110).

2) Eine Variante der o.a. Akkumulation autoreaktiver Zellen durch kreuzreaktive mikrobielle Antigene ist, dass verschiedene Infektionserreger Kreuzreaktivität mit dem gleichen Autoantigen hervorrufen können. In unserem Enzephalitis-Modell, z.B. wurde eine Vielzahl von Peptiden, die von verschiedenen Bakterien stammten, von den enzephalitogenen T-Zellen erkannt (86). Vorstellbar ist also ein Szenario, in dem durch aufeinanderfolgende Infektionen, in unserem Modell z.B. mit *M. tuberculosis* und *S. typhimurium*, T-Zellen aktiviert und expandiert werden, die das gleiche Autoantigen erkennen können. Durch die wiederholten Infektionen könnte dann eine kritische Zahl dieser T-Zellen überschritten werden. In solch einem Falle, in dem möglicherweise viele verschiedene Infektionserreger zur molekularen Mimikry beitragen wird es schwierig, wenn nicht unmöglich sein, einen Erreger, der mit der in Frage stehenden Autoimmunkrankheit assoziiert ist, zu definieren.

3) Die Mechanismen der molekularen Mimikry und der „Bystander Aktivierung“ schließen sich gegenseitig nicht aus, sondern können sich sogar ergänzen. So ist vorstellbar, dass genetische Prädisposition und molekulare Mimikry dafür sorgen, dass eine „kritische Zahl“ autoreaktiver Zellen vorhanden ist, die durch „Bystander Aktivierung“ aktiviert werden kann.

Im Laufe der letzten Jahre ist allerdings auch klar geworden, dass immunologische Kreuzreaktivität nicht notwendigerweise pathogen sein muß sondern höchstwahrscheinlich ein notwendiger Bestandteil der normalen Homöostase des Immunsystems ist.

1) Werden T-Zellen in Mäuse transferiert, die keine MHC – Moleküle exprimieren, sterben diese T-Zellen innerhalb kurzer Zeit (111, 112). Die wahrscheinlichste Erklärung für

diesen Befund lautet, dass naive T-Zellen der unterschwelligen Stimulation bedürfen um im Organismus zu überleben. In Abwesenheit von MHC-Molekülen, können keine kreuzreaktiven Peptide präsentiert werden, was den Untergang der T-Zellen zur Folge hat.

2) Theoretische Erwägungen deuten darauf hin, dass ein funktionierendes T-Zellrepertoire mit „monospezifischen“ T-Zellen nicht realisierbar ist, und ein gewisses Ausmaß an Kreuzreaktivität deshalb notwendig ist (81).

3) In jüngerer Zeit gibt es Hinweise darauf, dass autoreaktive T-Zellen, die durch molekulare Mimikry aktiviert werden könnten nicht notwendigerweise pathogen sein müssen, sondern protektive Funktionen haben können (113, 114).

4.1.6 Konsequenzen für die Pathogenese der therapieresistenten Lyme Arthritis

Folgende Schlußfolgerungen ergeben sich aus dem unerwartet hohen Ausmaß der Kreuzreaktivität für die Pathogenese der Lyme-Arthritis:

1) Es ist klar geworden, dass die bloße Kreuzreaktivität auf Peptid-Ebene nicht hinreichend ist um einen pathogenen Zusammenhang zwischen der T-Zellreaktivität mit einem gegebenen mikrobiellen Antigen (z.B. OspA) und einem bestimmten Selbstantigen zu postulieren. Für viele Infektions- und Autoimmunkrankheiten, auch für die Lyme-Borreliose (109, 115) sind Arbeiten publiziert worden, die über Sequenzhomologien zwischen mikrobiellen und Autoantigenen berichten und zeigen, dass Antikörper oder T-Zellen, die für das eine Peptid spezifisch sind, auch das andere erkennen. Wenn – ohne weitere Daten – aus solchen Befunden ein kausaler Zusammenhang zwischen der in frage stehenden Infektionskrankheit und Autoimmunität abgeleitet wird, sind solche Schlußfolgerungen nach heutigem Stand als unbegründet zurückzuweisen.

2) Selbstverständlich schließt keiner unserer hier und unter 2.1.2 dargestellten Befunde die Möglichkeit aus, dass unter bestimmten experimentellen oder klinischen Bedingungen molekulare Mimikry für die Induktion von Autoimmunität verantwortlich sein könnte (s. 2.1.2.3). Insofern bleiben die Hinweise auf eine mögliche Immunpathogenese der therapieresistenten Lyme-Arthritis und die Tatsache, dass OspA bevorzugt von Patienten mit therapieresistenter Lyme Arthritis erkannt wird interessant. Dies insbesondere mit Hinblick auf die Tatsache, dass rekombinantes OspA in den U.S.A. als Impfstoff gegen die Lyme-Borreliose zugelassen ist.

Um die Kreuzreaktivität bei Patienten mit Lyme-Arthritis zu untersuchen, ohne den „Umweg“ über das Anlegen von T-Zelllinien oder Klonen zu gehen, sind wir dabei HLA-DR4/OspA-Peptid Tetramere herzustellen. Im HLA-DR4-transgenen untersuchen wir die Frage unter welchen Bedingungen Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen und Selbstantigenen möglicherweise pathologische Konsequenzen hat. Eine Schwierigkeit dieser Untersuchungen besteht darin, dass bei der Vielzahl der verschiedenen erkannten Selbstantigene nicht immer auf der Hand liegt welche pathologischen Konsequenzen durch eine Autoreaktivität gegen ein bestimmtes dieser Antigene zu erwarten wären (z. B. Apolipoprotein B-100 Precursor). In anderen Fällen, z.B. der Kreuzreaktivität zwischen OspA und dem humanen Pro-Insulin wird ein pathologischer Zusammenhang schon allein dadurch unwahrscheinlich, dass keine Assoziation zwischen einer Infektion mit *B. burgdorferi* und Typ I Diabetes mellitus bekannt ist. Wieder andere kreuzreaktiv erkannte Selbstantigene (z.B.

Myosin) „passen“ zum Spektrum der von *B. burgdorferi* verursachten Pathologien. Allerdings haben jüngste Befunde in einem Mausmodell autoimmuner Arthritis drastisch klar gemacht, dass organspezifische Autoimmunkrankheiten auch durch Autoimmunität gegen ubiquitär exprimierte Selbstantigene (im vorliegenden Fall Glukose-6-Phosphat-Isomerase) verursacht werden können (116). Deshalb sind auch die von uns identifizierten ubiquitär exprimierten Selbstantigene, die von OspA-spezifischen Th-Zellen erkannt werden, nicht *a priori* außer acht zu lassen.

4.2 Ex vivo Detektion der Th-Differenzierung bei Infektion und Autoimmunität: Möglichkeit zur spezifischen Immunmodulation?

Chronische Infektionen, Autoimmunkrankheiten und allergische Erkrankungen sind oftmals durch das Überwiegen einer Th-Subpopulation charakterisiert (Übersichten in (44, 45)). Zum besseren Verständnis der Immunregulation und als möglicher Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen wären daher „Marker“ anhand derer sich Th-Subpopulationen *ex vivo* identifizieren und möglichst auch modulieren lassen, von größtem Wert. In den oben abgedruckten Arbeiten (50, 59) konnte wir zeigen, dass T1/ST2, ein zur IL-1 Rezeptorfamilie gehörender Orphan-Rezeptor, *in vitro* und *in vivo* präferentiell auf Th2 Zellen exprimiert wird. Dieser Befund wurde ebenso von einer anderen Arbeitsgruppe erhoben (58). *In vivo* korreliert die Expression von T1/ST2 auf CD4⁺ Zellen mit der Lokalisation von Typ 2 Immunantworten (50). Wichtiger als diese reine „Markerfunktion“ ist die Tatsache, dass T1/ST2 für die Effektorfunktion der Th2 Zellen wichtig ist. In einem Mausmodell bronchialer Hyperreaktivität haben wir gezeigt, dass Th2-Effektorfunktionen *in vivo* sowohl durch Injektion des löslichen T1/ST2 Moleküls, als auch durch Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen T1/ST2 spezifisch inhibiert werden können (59, 60, 117). Aus der Tatsache, dass sowohl rekombinantes T1/ST2, als auch der monoklonale Antikörper die Th2 Effektorfunktion modulierten, kann geschlossen werden, dass dieser Effekt durch die Inhibition von T1/ST2 mit seinem derzeit noch unbekanntem Liganden und nicht durch Depletion der T1/ST2⁺ Zellen erzielt wird. Diese Vermutung wird weiter durch unsere Untersuchungen gestützt, die gezeigt haben, dass die Kreuzvernetzung von T1/ST2 Rezeptoren auf der Zelloberfläche mittels plattengebundener Antikörper *in vitro* in Th2 Zellen Proliferation sowie die Produktion von IL-4 und IL-5 induziert (61).

Insgesamt kann also vermutet werden, dass T1/ST2 ein Th2-spezifischer kostimulatorischer Rezeptor ist. Wie werden Th2 Zellen *in vivo* durch T1/ST2 aktiviert? Wir haben in Kollaboration mit L. O'Neill und seiner Arbeitsgruppe (Dept. Biochemistry, Trinity College, Dublin, Irland) begonnen die Signaltransduktionskaskade, die durch Kreuzvernetzung von T1/ST2 induziert wird, zu untersuchen. Obwohl T1/ST2 ein Mitglied der IL-1R Familie ist, wird durch seine Kreuzvernetzung keine NFκB Translokation induziert (unveröffentlichte Beobachtungen). Insofern unterscheidet sich die Signaltransduktion nach Ligation von T1/ST2 schon von der Signaltransduktion nach Ligation anderer Mitglieder der IL-1R Familie; die genauen Mechanismen sind Gegenstand unserer laufenden Untersuchungen. Wie wird die Signaltransduktion durch T1/ST2 physiologischerweise initiiert? Bis heute ist der physiologische Ligand für T1/ST2 unbekannt. Die Suche nach dem T1/ST2 Liganden sollte nicht nur unser Verständnis der Funktion dieses Th2-spezifischen Oberflächenmoleküles vertiefen, sondern auch neue Möglichkeiten zur

Immunmodulation eröffnen und wird derzeit in verschiedenen Laboren, darunter unserem eigenen, intensiv verfolgt.

Ein humanes Homolog für T1/ST2 ist bekannt (118). Ist T1/ST2 also geeignet zur Modulation pathogener Th2-Antworten im Menschen? Diese Frage kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden, da es weder uns, noch einer anderen Arbeitsgruppe, bisher gelungen ist, die Expression des humanen T1/ST2 Proteins auf T-Zellen durchflußzytometrisch nachzuweisen. Dies ist umso erstaunlicher, als wir humane T-Zelllinien untersucht haben, in denen wir mit der PCR mRNA sowohl für die lösliche, als auch für die membrangebundene Form des T1/ST2 nachweisen konnten. Dennoch gelang mit den derzeit zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörpern der Nachweis von T1/ST2 weder auf der Zelloberfläche, noch intrazellulär. In Anbetracht der funktionellen Bedeutung von T1/ST2 für Th2-Effektorfunktionen im Mausmodell bleibt der Versuch entsprechende Reagenzien für Untersuchungen der Expression und der funktionellen Bedeutung des humanen T1/ST2 ein Arbeitsschwerpunkt in verschiedenen Labors, unter anderem unserem eigenen.

Th2 Zellen können durch ihre Expression von T1/ST2 identifiziert werden. Ein Molekül, das die Identifikation lebender Th1 Zellen *ex vivo* erlaubt ist bislang noch nicht beschrieben worden, der IL-18 Rezeptor kann aber diesbezüglich als „Kandidat“ gelten (119). Da Autoimmunerkrankungen häufig durch eine Überwiegen von Th1 Zellen charakterisiert sind, wäre es sehr wünschenswert Membranproteine zu definieren, die präferentiell von Th1 Zellen exprimiert werden und es möglicherweise erlauben die Funktion von Th1 Zellen spezifisch zu modulieren. In der oben erwähnten representational difference analysis (59) wurde auch eine mRNA identifiziert, deren Expression Th1-spezifisch zu sein scheint. Im Labor von J.-C. Gutierrez-Ramos (Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, U.S.A.) wurde das von dieser mRNA kodierte Protein rekombinant hergestellt und Rattenantikörper dagegen produziert. Die ersten in unserem Labor durchgeführten durchflußzytometrischen Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass auch das Protein präferentiell auf der Zellmembran von Th1, nicht aber Th2 Lymphozyten exprimiert wird.

4.2.1 Ex vivo Detektion der Th-Differenzierung bei Infektion und Autoimmunität: wie häufig sind Th1 und Th2 Zellen *in vivo*?

Dass Th-Zellen sich anhand ihrer Zytokinproduktion in unterschiedliche Subklassen kategorisieren lassen, wurde bei der Analyse der Zytokinproduktion muriner T-Zellklone entdeckt (120). *In vivo* lassen sich „Th1-dominierte“ oder „Th2-dominierte“ Immunantworten in chronischen Infektionen (45, 121, 122), Autoimmunkrankheiten (44, 123) oder allergischen Erkrankungen nachweise (60, 124). Bis vor kurzem war allerdings noch recht wenig über die Zytokinproduktion einzelner Th-Zellen *in vivo* bekannt, da die meisten Untersuchungen an Populationen durchgeführt worden waren. In einer der oben abgedruckten Arbeiten haben wir deshalb erstmals die Zytokinproduktion einer großen Zahl individueller Zellen *ex vivo* durchflußzytometrisch untersucht (50). Diese Untersuchungen haben wir im murinen Infektionsmodell mit *Schistosoma mansoni* durchgeführt. Initial ist die Immunantwort gegen *S. mansoni* durch ein Überwiegen von Typ1 Zytokinen gekennzeichnet, in den späteren Stadien überwiegt dann die Produktion von Typ 2 Zytokinen (45, 50). Diese Plastizität der Immunantwort und die Tatsache, dass sich die antigenspezifischen Th Zellen in diesem Modell räumlich und zeitlich gut lokalisieren lassen (50) machen *S. mansoni* zu einem

geeigneten Modell zur Untersuchung der Zytokinproduktion individueller Th Zellen. In unseren Untersuchungen haben wir gleichzeitig die intrazelluläre Expression von jeweils drei verschiedenen Zytokinen und die Oberflächenexpression von T1/ST2 untersucht. Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen war dass individuelle Th-Zellen *in vivo* häufig Typ 1 und Typ 2 Zytokine koexprimieren. Das gemeinhin als Typ 1 Zytokin angesehene IL-2 z.B. wurde häufig von Th-Zellen, die IL-4 oder IL-5 produzierten, koexprimiert. Anders als bei unseren initialen Untersuchungen an Th-Zellen aus unimmunisierten gesunden Mäusen (59) produzierte im Schistosomen-Infektionsmodell auch die Mehrzahl der T1/ST2⁺ Th Zellen IL-2. Die genauere Analyse der Koexpression verschiedener Zytokine in individuellen Th Zellen zeigte allerdings, dass diese Plastizität nicht in allen Zellen gleichermaßen vorhanden ist. Unsere Analyse aller CD4⁺ Zellen aus Schistosomen-induzierten Granulomen zeigte, dass in individuellen Th Zellen die Expression von IFN- γ statistisch signifikant positiv mit der Expression von IL-4 assoziiert war. Diese positive Assoziation von IFN- γ war nicht mehr vorhanden, wenn Zellen untersucht wurden, die entweder zwei Typ 1 Zytokine (z.B. IFN- γ und IL-2), oder zwei Typ 2 Zytokine (z.B. IL-4 und IL-5) produzierten. Auch die Expression von T1/ST2 auf der Zelloberfläche machte die Co-Expression von IFN- γ und IL-4 unwahrscheinlich (59). Diese Befunde sind gut mit der Vorstellung vereinbar, dass die Zytokin-Expression individuelle Th-Zellen zunächst plastisch und noch nicht auf ein Th1 oder Th2 Muster festgelegt ist. Die Ko-Expression zweier Typ2 Zytokine oder eines Typ2 Zytokines gemeinsam mit T1/ST2 sind diesem Modell zufolge Zeichen einer fortgeschrittenen Th2-Differenzierung.

Die meisten der *ex vivo* aus Schistosomen-induzierten Granulomen isolierten Th-Zellen produzierten sowohl Typ1, als auch Typ 2 Zytokine, entsprachen also nicht den typischen Th1 oder Th2 Mustern. Für diesen Befund gibt es mindestens drei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

1) Vielleicht gibt es *in vivo* überhaupt keine „klassischen“ Th1 oder Th2 Zellen, die ein „Set“ von Zytokinen (Typ 1 oder Typ2), nicht aber das andere „Set von Zytokinen exprimieren? Die ausgeprägte Th1 oder Th2 Polarisierung, die sich *in vitro* erzielen lässt, beruht zumindest teilweise auf der gegenseitigen Inhibition der beiden Th subsets und darauf, dass der IL-12 Signaltransduktionsweg in Th2 Zellen „abgeschaltet“ wird wohingegen der IL-4 Signaltransduktionsweg in Th1 Zellen „abgeschaltet“ wird (Übersicht in (46)). Schon die Gegenwart geringer Konzentrationen von IFN- γ reicht aus, um auch in Th2 Zellen den IL-12 Signaltransduktionsweg zu erhalten. Während Th2 Zellen *in vitro* durch Zugabe von IL-4, anti-IL-12 und häufig auch α -IFN- γ polarisiert werden und nicht mehr zur Produktion von Th1 Zytokinen angeregt werden können, ist leicht vorstellbar, dass die zur Aufrechterhaltung der IL-12 Signaltransduktion notwendigen IFN- γ Konzentrationen *in vivo* zumeist gegeben sein werden. In den „Th2-dominierten“ Schistosomen-induzierten Granulomen waren jedenfalls zu allen von uns untersuchten Zeitpunkten immer auch IFN- γ produzierende Th-Zellen nachweisbar (50). Es ist also anzunehmen, dass Th-Zellen *in vivo* eine größere Plastizität aufweisen als *in vitro* differenzierte Th Zellen.

2) Möglicherweise ist die von uns beobachtete Plastizität eine Besonderheit der Immunantwort auf *S. mansoni*. Die von uns gefundene Koexpression von IL-4 oder IL-5 mit IL-2 wird in Th2 Zellen, die *in vitro* differenziert wurden, nicht beobachtet. Allerdings ist schon früher im Modell der *S. mansoni* Infektion beschrieben worden, dass IL-2 sowohl für

die IL-5 Produktion, als auch für die Formation von Granulomen von entscheidender Bedeutung ist (125). Um diese Möglichkeit zu testen, untersuchten wir die Zytokin Koexpression in Mäusen, die mit *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert waren. Die *N. brasiliensis* Infektion ist ein klassisches Modell für Th2-Immunantworten. In Th-Zellen aus dem Darm infizierter Mäuse fanden wir, wie im *S. mansoni* Infektionsmodell, eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von IL-2 mit IL-4 und mit IL-5 (K. Bonhagen & T. Kamradt, unveröffentlichte Beobachtungen). Diese Korrelation ist also kein Spezifikum des *S. mansoni* Infektionsmodelles.

3) Schließlich ist es möglich, dass die extreme Polarisierung nach Th1 oder Th2, die man *in vitro* beobachten kann auch *in vivo* erst nach längeren Zeiträumen auftritt. Im Schistosomenmodell haben wir die Mäuse 7 Wochen nach der Injektion von *S. mansoni* Eiern untersucht (50) und die Immunantwort nach Infektion mit *N. brasiliensis* wurde 2 Wochen nach Infektion untersucht.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass sich die Dynamik und Plastizität der Th-Differenzierung *in vivo* mit Hilfe Populationsspezifischer Membranproteine wie T1/ST2 sehr viel genauer erfassen lassen, als das bislang der Fall war. Unsere hier vorgestellten Daten sind ein Beispiel für solche Untersuchungen und zeigen, dass die Zytokin-Koexpression von Th-Zellen *in vivo* sich auf teilweise unerwartete Weise von den *in vitro* bekannten Th1/Th2 Mustern unterscheidet.

5. Literatur

1. Harris, H. F. 1899. A case of diabetes quickly following mumps. On the pathological alterations of salivary glands, closely resembling those found in pancreas, in a case of diabetes mellitus. *Boston Med Surg J.* CXL: 465-469
2. Gibofsky, A., S. Kerwar, J. B. Zabriskie. 1998. Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 24: 237-59
3. Panitch, H. S. 1994. Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 36: S25-S28
4. Kurtzke, J. F. 1993. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev.* 6: 382-427
5. Gamble, D. R. 1980. The epidemiology of insulin-dependent diabetes with particular reference to the relationship of virus Infection to its etiology. *Epidemiol Rev.* 2: 49-70
6. Markowitz, A. S. 1969. Streptococcal-related glomerulonephritis in the Rhesus monkey. *Transplant Proc.* 1: 985-91
7. Fujinami, R. S., M. B. Oldstone. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* 230: 1043-1045
8. Lafaille, J. J., K. Nagashima, M. Katsuki, S. Tonegawa. 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell.* 78: 399-408
9. Oldstone, M. B. A. 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* 12: 1255-1265
10. Kitze, B., M. Pette, E. Rohrbach, D. Stadt, L. Kappos, H. Wekerle. 1988. Myelin-specific T lymphocytes in multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Neuroimmunol.* 20: 237
11. Naquet, P., J. Ellis, D. Tibensky, A. Kenshole, B. Singh, R. Hodges, T. L. Delovitch. 1988. T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J Immunol.* 140: 2569-78
12. Souroujon, M., M. E. White-Scharf, J. Andreschwartz, M. L. Gefter, R. S. Schwartz. 1988. Preferential autoantibody reactivity of the preimmune B cell repertoire in normal mice. *J Immunol.* 140: 4173-9
13. Parry, S. L., F. C. Hall, J. Olson, T. Kamradt, G. Sønderstrup. 1998. Autoreactivity versus autoaggression: a different perspective on human autoantigens. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 663-668
14. Kamradt, T., N. A. Mitchison. 2000. Advances in Immunology: T cell tolerance and autoimmunity. *N. Engl. J. Med. in press*
15. Miller, S. D., C. L. Vanderlugt, W. Smith-Begolka, W. Pao, R. L. Yauch, K. L. Neville, Y. Katz-Levy, A. Carrizosa, B. S. Kim. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nature Med.* 3: 1133- 1136
16. Tough, D. F., P. Borrow, J. Sprent. 1996. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science:* 1947- 1950

17. Ehl, S., J. Hombach, P. Aichele, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel. 1997. Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J Exp Med.* 185: 1241-51
18. Butz, E. A., M. J. Bevan. 1998. Massive expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells during an acute virus infection. *Immunity.* 8: 167-75
19. Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, R. Ahmed. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 8: 177-87
20. Tough, D. F., S. Sun, J. Sprent. 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med.* 185: 2089-2094
21. Infante-Duarte, C., T. Kamradt. 1997. Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in $\alpha\beta$ TCR transgenic mice. *Infect. Immun.* 65: 4094-4099
22. Kamradt, T., P. D. Soloway, D. L. Perkins, M. L. Geffer. 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. Immunol.* 147: 3296-3302
23. Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 2879-83
24. Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med.* 189: 821-9
25. White, J., A. Herman, A. M. Pullen, R. Kubo, J. W. Kappler, P. Marrack. 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell.* 56: 27-35
26. Perron, H., J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P. W. Tuke, C. Voisset, J. L. Blond, B. Lalande, J. M. Seigneurin, B. Mandrand. 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.* 94: 7583-8
27. Kawabe, Y., A. Ochi. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature.* 349: 245-248
28. Damian, R. T. 1964. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am Nat.* 98: 129-149
29. Jahnke, U., E. H. Fischer, E. C. J. Alvord. 1985. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science.* 229: 282-284
30. Kamradt, T., A. Krause, S. Priem, G.-R. Burmester. 1998. Lyme Arthritis. Klinik, Diagnostik und Therapie. *Dt. Arztebl.* 95: A-214-219
31. Steere, A. C., R. T. Schoen, E. Taylor. 1987. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med.* 107: 725-731
32. Steere, A. C., A. Gibofsky, M. E. Patarroyo, R. J. Winchester, J. A. Hardin, S. E. Malawista. 1979. Chronic Lyme arthritis. Clinical and immunogenetic differentiation from rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 90: 896-901

33. Steere, A. C., R. E. Levin, P. J. Molloy, R. A. Kalish, J. H. Abraham, III, N. Y. Liu, C. H. Schmid. 1994. Treatment of Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 37: 878-888
34. Burmester, G. R., A. Daser, T. Kamradt, A. Krause, N. A. Mitchison, J. Sieper, N. Wolf. 1995. The immunology and immunopathology of reactive arthritides. *Annu Rev Immunol.* 13: 229-250
35. Kamradt, T., A. Krause, G.-R. Burmester. 1995. A role for T cells in the pathogenesis of treatment-resistant Lyme arthritis? *Mol. Med.* 1: 486-490
36. Nocton, J. J., F. Dressler, B. J. Rutledge, P. N. Rys, D. H. Persing, A. C. Steere. 1994. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid in Lyme arthritis. *N. Engl. J. Med.* 330: 229-234
37. Priem, S., M. G. Rittig, T. Kamradt, K. Wolbart, G. R. Burmester, A. Krause. 1998. Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Ann Rheum Dis.* 57: 118-121
38. Steere, A. C., E. D. Dwyer, R. Winchester. 1990. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N. Engl. J. Med.* 323: 219-223
39. Zamvil, S. S., L. Steinman. 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalitis. *Annu Rev Immunol.* 8: 579-621
40. Steinman, L. 1996. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell.* 85: 299-302
41. Zamvil, S. S., D. J. Mitchell, A. C. Moore, K. Kitamura, L. Steinman, J. B. Rothbard. 1986. T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature.* 324: 258-60
42. Olivares-Villagomez, D., Y. Wang, J. J. Lafaille. 1998. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 188: 1883-94
43. Abbas, A. K., K. M. Murphy, A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383: 787-793
44. Kamradt, T., G.-R. Burmester. 1998. Cytokines and arthritis: is the Th1/Th2 paradigm useful for understanding pathogenesis? *J. Rheumatol.* 25: 6-8
45. Infante Duarte, C., T. Kamradt. 1999. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol.* 21: 317-338
46. Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar, J. Yang, S. Ranganath, H. Asnagli, M. Afkarian, T. L. Murphy. 2000. Signalling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol.* 18: 451-494
47. Firestein, G. S., W. D. Roeder, J. A. Laxer, K. S. Townsend, C. T. Weaver, J. T. Hom, J. Linton, B. E. Torbett, A. L. Glasebrook. 1989. A new murine CD4⁺ cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143: 518-525
48. Chen, Y., V. K. Kuchroo, J.-L. Inobe, D. A. Hafler, H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265: 1237-1240
49. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, M. G. Roncarolo. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389: 737-742

50. Löhning, M., J. L. Grogan, A. J. Coyle, C. Meisel, M. Yazdanbakhsh, J. C. Gutierrez-Ramos, A. Radbruch, T. Kamradt. 1999. Expression of T1/ST2 is enhanced on CD4⁺ T cells from schistosome egg-induced granulomas: Analysis of T helper cell cytokine co-expression *ex vivo*. *J. Immunol.* 162: 3882-3889
51. Keffer, J., L. Probert, H. Cazlaris, S. Georgopoulos, E. Kaslaris, D. Kioussis, G. Kollias. 1991. Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.* 10: 4025-4031
52. Horwitz, M. S., C. F. Evans, D. B. McGavern, M. Rodriguez, M. B. Oldstone. 1997. Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. *Nat Med.* 3: 1037-41
53. Zhao, Z.-S., F. Granucci, L. Yeh, P. A. Schaffer, H. Cantor. 1998. Molecular mimicry by Herpes Simplex Virus-Type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science.* 279: 1344-1347
54. Gangappa, S., J. Babu, J. Thomas, M. Daheshia, B. Rouse. 1998. Virus-induced immunoinflammatory lesions in the absence of viral antigen recognition. *J. Immunol.* 161: 4289-4300
55. Yin, Z., J. Braun, L. Neure, P. Wu, A. Krause, T. Kamradt, J. Sieper. 1997. T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthr Rheum.* 40: 69-79
56. Infante-Duarte, C., H. Horton, M. C. Byrne, T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in T helper (Th) cells. *J. Immunol.* 165: *in press*
57. Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 875-883
58. Xu, D., W. L. Chan, B. P. Leung, F. Huang, R. Wheeler, D. Piedrafita, J. H. Robinson, F. Y. Liew. 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J. Exp. Med.* 187: 787-794
59. Löhning, M., A. Stroehmann, A. J. Coyle, J. L. Grogan, S. Lin, J. C. Gutierrez-Ramos, D. Levinson, A. Radbruch, T. Kamradt. 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of IL-4, IL-5, and IL-10, and important for Th2 effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6930-6935
60. Coyle, A. J., C. Lloyd, J. Tian, T. Nguyen, C. Eriksson, L. Wang, P. Ottoson, P. Persson, T. Delaney, S. Lehar, S. Lin, L. Poisson, C. Meisel, T. Kamradt, T. Bjerke, D. Levinson, J. C. Gutierrez-Ramos. 1999. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J. Exp. Med.* 190: 895-902
61. Meisel, C., K. Bonhagen, M. Löhning, A. C. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, A. Radbruch, T. Kamradt. Regulation and function of T1/ST2-expression on CD4⁺ T cells. Induction of type 2 cytokine production by T1/ST2-crosslinking. *J. Immunol.* *in revision*
62. Bucy, R. P., A. Panoskaltsis-Mortari, G. Q. Huang, J. Li, M. Ross, J. H. Russel, L. Karr, K. M. Murphy, C. T. Weaver. 1994. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. *J. Exp. Med.* 180: 1251-1262
63. Kelso, A., P. Groves, A. B. Truitt, K. Francis. 1995. Evidence for the stochastic acquisition of cytokine profile by CD4⁺ T cells activated in a T helper type 2-like response in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25: 1168-1175

64. Assenmacher, M., J. Schmitz, A. Radbruch. 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon- γ and interleukin-4-expressing cells. *Eur. J. Immunol.* 24: 1097-1101
65. Openshaw, P., E. E. Murphy, N. A. Hosken, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, A. O'Garra. 1995. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J. Exp. Med.* 182: 1357-1367
66. Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, A. O'Garra. 1996. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J. Exp. Med.* 183: 901-913
67. Sornasse, T., P. V. Larenas, K. A. Davis, J. E. de Vries, H. Yssel. 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4⁺ T cells, analyzed at the single-cell level. *J. Exp. Med.* 184: 473-483
68. Assenmacher, M., M. Löhning, A. Scheffold, R. Manz, J. Schmitz, A. Radbruch. 1998. Sequential production of IL-2, IFN- γ and IL-10 by individual Th lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 28: 1534-1543
69. Lengel-Janßen, B., A. F. Strauss, A. C. Steere, T. Kamradt. 1994. The T helper cell response in Lyme arthritis: Differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. *J. Exp. Med.* 180: 2069-2078
70. Fugger, L., S. A. Michie, I. Rulifson, C. B. Lock, G. Sønderstrup McDevitt. 1994. Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region β -chain T-cell repertoire and mediates an HLA-DR-restricted immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6151-6155
71. Taneja, V., C. S. David. 1998. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J. Clin. Invest.* 101: 921-926
72. Kramer, A., J. Schneider-Mergener. 1998. Synthesis and application of peptide libraries bound to continuous cellulose membranes. *Meth. Mol. Biol.* 87: 25-39
73. Maier, B., M. Molinger, A. P. Cope, L. Fugger, J. Schneider-Mergener, G. Sønderstrup, T. Kamradt, A. Kramer. 2000. Multiple cross-reactive self ligands for *Borrelia burgdorferi*-specific HLA-DR4-restricted T cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 448-457
74. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science.* 250: 1720-1723
75. Klemenz, R., S. Hoffmann, A. K. Werenskiold. 1989. Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5708-5712
76. Tominaga, S. 1989. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *Febs Lett.* 258: 301-304
77. Kumar, S., M. D. Minnich, P. R. Young. 1995. ST2/T1 protein functionally binds to two secreted proteins from Balb/c 3T3 and human umbilical vein endothelial cells but does not bind interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 270: 27905-27913
78. Kamradt, T., B. Lengel-Janßen, A. F. Strauss, G. Bansal, A. C. Steere. 1996. Dominant recognition of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A-peptide by T helper cells in patients with treatment-resistant Lyme arthritis. *Infect. Immun.* 64: 1284-1289

79. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*. 76: 287-99
80. Tian, J., P. V. Lehmann, D. L. Kaufmann. 1994. T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele. *J. Exp. Med.* 180: 1979-1984
81. Mason, D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today*. 19: 395-404
82. Kersh, G. J., P. M. Allen. 1996. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature*. 380: 495-498
83. Wucherpfennig, K. W., J. L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 80: 695-705
84. Ignatowicz, L., J. Kappler, P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*. 84: 521-9
85. Garboczi, D. N., W. E. Biddison. 1999. Shapes of MHC restriction. *Immunity*. 10: 1-7
86. Grogan, J. L., A. Kramer, A. Nogai, L. Dong, M. Ohde, J. Schneider-Mergener, T. Kamradt. 1999. Crossreactivity of MBP-specific T cells with multiple microbial peptides: EAE-induction in TCR transgenic mice. *J. Immunol.* 163: 3764-3770
87. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, S. J.L., D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 329: 506-512
88. Madden, D. R., J. C. Gorga, J. L. Strominger, D. C. Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*. 70: 1035-48
89. Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, D. C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. *Nature*. 364: 33-9
90. Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung, H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 351: 290-296
91. Jardetzky, T. S., W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden, D. C. Wiley. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*. 353: 326-9
92. Rammensee, H. G., T. Friede, S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41: 178-228
93. Reay, P. A., R. M. Kantor, M. M. Davis. 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.* 152: 3946-57
94. Hemmer, B., M. Vergelli, C. Pinilla, R. Houghten, R. Martin. 1998. Probing degeneracy in T-cell recognition using combinatorial peptide libraries. *Immunol. Today*. 19: 163-168
95. Hemmer, B., M. Vergelli, B. Gran, N. Ling, P. Conlon, C. Pinilla, R. Houghton, H. F. McFarland, R. Martin. 1998. Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J. Immunol.* 160: 3631-3636

96. Ignatowicz, L., W. Rees, R. Pacholczyk, H. Ignatowicz, E. Kushnir, J. Kappler, P. Marrack. 1997. T cells can be activated by peptides that are unrelated in sequence to their selecting peptide. *Immunity*. 7: 179-86
97. Hemmer, B., B. Gran, Y. Zhao, A. Marques, J. Pascal, A. Tzou, T. Kondo, I. Cortese, B. Bielekova, S. E. Straus, H. F. McFarland, R. Houghten, R. Simon, C. Pinilla, R. Martin. 1999. Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med*. 5: 1375-1382
98. van Eden, W., J. Holoshitz, Z. Nevo, A. Frenkel, A. Klajman, I. R. Cohen. 1985. Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 5117-5120
99. Garza, K. M., K. S. Tung. 1995. Frequency of molecular mimicry among T cell peptides as the basis for autoimmune disease and autoantibody induction. *J Immunol*. 155: 5444-8
100. Bachmaier, K., N. Neu, L. M. de la Maza, S. Pal, A. Hessel, J. M. Penninger. 1999. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science*. 283: 1335-1339
101. Singh, V. K., K. Yamaki, L. A. Donoso, T. Shinohara. 1989. Molecular mimicry. Yeast histone H3-induced experimental autoimmune uveitis. *J Immunol*. 142: 1512-7
102. Horwitz, M. S., L. M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee, N. Sarvetnick. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*. 4: 781-785
103. Evans, C. F., M. S. Horwitz, M. V. Hobbs, M. B. Oldstone. 1996. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med*. 184: 2371-84
104. Kühn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. Müller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 75: 263-274
105. Green, E. A., R. A. Flavell. 2000. The temporal importance of TNF α expression in the development of diabetes. *Immunity*. 12: 459-69
106. Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart, P. Miossec. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 42: 963-70
107. Ziolkowska, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska, W. Maslinski. 2000. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol*. 164: 2832-8
108. Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, H. Link. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 5: 101-4
109. Gross, D. M., T. Forsthuber, M. Tary-Lehmann, C. Etling, K. Ito, Z. A. Nagy, J. A. Field, A. C. Steere, B. T. Huber. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. *Science*. 281: 703-706
110. Anderson, A. C., L. B. Nicholson, K. L. Legge, V. Turchin, H. Zaghouni, V. K. Kuchroo. 2000. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in

the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med.* 191: 761-70

111. Kirberg, J., A. Berns, H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med.* 186: 1269-75

112. Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist, D. Mathis. 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med.* 191: 355-64

113. Kerschensteiner, M., E. Gallmeier, L. Behrens, V. V. Leal, T. Misgeld, W. E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R. L. Oropenza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld. 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: A neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 189: 865-870

114. Ruiz, P. J., H. Garren, D. L. Hirschberg, A. M. Langer-Gould, M. Levite, M. V. Karpuj, S. Southwood, A. Sette, P. Conlon, L. Steinman. 1999. Microbial epitopes act as altered peptide ligands to prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 189: 1275-1284

115. Fikrig, E., R. Berland, M. Chen, S. Williams, L. H. Sigal, R. A. Flavell. 1993. Serologic response to the *Borrelia burgdorferi* flagellin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 183-7

116. Matsumoto, I., A. Staub, C. Benoist, D. Mathis. 1999. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* 286: 1732-5

117. Lambrecht, B. N., M. De Veerman, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans, R. A. Pauwels. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest.* 106: 551-9

118. Tominaga, S., T. Yokota, K. Yanagisawa, T. Tsukamoto, T. Takagi, T. Tetsuka. 1992. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta.* 1171: 215-218

119. Xu, D., W. L. Chan, B. P. Leung, D. Hunter, K. Schulz, R. W. Carter, I. B. McInnes, J. H. Robinson, F. Y. Liew. 1998. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med.* 188: 1485-92

120. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. Bond, M. A. Gledlin, R. L. Coffman. 1986. Two types of mouse helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activation and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357

121. Heinzl, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman, R. M. Locksley. 1989. Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169: 59-72

122. Yamamura, M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, R. L. Modlin. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 254: 277-279

123. Liblau, R. S., S. M. Singer, H. O. McDevitt. 1995. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today.* 12: 34-38

124. Donovan, C. E., P. W. Finn. 1999. Immune mechanisms of childhood asthma. *Thorax*. 54: 938-46
125. Cheever, A. W., F. D. Finkelman, P. Caspar, S. Heiny, J. G. Macedonia, A. Sher. 1992. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.* 148: 3244-3248

6. Abkürzungsverzeichnis

APZ, Antigen präsentierende Zelle; EAE, experimentell autoimmune Enzephalitis; IL, Interleukin; IFN, Interferon; LPS, Lipopolysaccharid; MBP basisches Myelinprotein (engl.: myelin basic protein); MHC, Major Histocompatibility Complex; OspA, Outer surface protein A (von *B. burgdorferi*); Th, T-Helferzellen; TNF, Tumor Nekrosefaktor; TZR, T-Zellrezeptor

7. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Kollegen und Co-Autoren, die am Zustandekommen der hier dargestellten Publikationen beteiligt waren.

Besonders hervorzuheben sind die Beiträge einiger Individuen, die nicht in jedem Fall in Ko-Autorenschaften reflektiert werden:

Malcolm Gefer, der einen Kliniker ohne jede Laborpraxis in seinem Labor arbeiten ließ. Ihm verdanke ich wesentliche Anteile meiner wissenschaftlichen „Anschauung“, Urteile und Vorurteile.

Av Mitchison und Gerd Burmester haben eine – in Deutschland noch extrem seltene – Organisationsstruktur geschaffen, die es mir ermöglicht hat gleichzeitig wissenschaftlich und klinisch zu arbeiten. Anders hätte sich diese Arbeit nicht verwirklichen lassen.

Andreas Radbruch, der seine innovativen Technologien großzügig zum Allgemeingut gemacht hat. Ohne diese Instrumente hätten viele der hier bearbeiteten Fragen gar nicht gestellt werden können.

Ute und Bernhard Kamradt, die mich, manchmal kopfschüttelnd aber immer vorbehaltlos, unterstützt haben.

Anja, Johanna, Jasper und Robert Kamradt, die eigene Interessen oftmals zugunsten meiner Arbeit zurückgestellt haben.

Danke!