

**Von Toleranz zur Autoimmunität. In vivo Analysen über die Funktion und die
Bedeutung autoreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen**

Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Immunologie

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

von

Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Johannes Steinhoff

geb. am 22.01.1959 in Karlsruhe

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

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. H-G Rammensee
 2. Priv. Doz. Dr. B. Arnold

eingereicht: 15. Jan.2002

Inhaltsverzeichnis:

1	Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse	4
1.1	Thematik	4
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Toleranzmechanismen	6
2.1.1	Zentrale Toleranz	6
2.1.2	Periphere Toleranz	7
2.1.3	Periphere Deletion	7
2.1.4	Ignoranz	8
2.1.5	Anergie	8
2.2	Regulatorische T-Zellen	9
2.3	Hitzeschockproteine und Autoimmunität	10
2.4	Antigenprozessierung durch das proteasomale System	12
3	Methodische Grundlagen und Neuentwicklungen	13
3.1	Die VSV-Glykoprotein (VSV-G) spezifische Immunantwort	13
3.2	Die Hsp60-spezifische Immunantwort	14
3.3	Organspezifische Antigenprozessierung durch das 20S Proteasom	15
3.4	Die T-Zellrezeptoranalyse	16
4	Analyse autoreaktiver CD4 ⁺ T-Zellen in VSV-G transgenen Tieren	17
4.1	Toleranzinduktion und Reaktivierung von VSV-G spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	17
4.2	Variierende Toleranz bei entwicklungsabhängiger Expression von VSV-G	20
5	Hitzeschockprotein-kreuzreaktive CD8 ⁺ T-Zellen und Autoimmunität	22
5.1	Bakterien Hsp60 induzierte CD8 ⁺ T-Zellen reagieren mit murinem Homolog	22
5.2	Immunpathologie durch Hsp60 reaktive CD8 ⁺ T-Zellen	23
5.3	Untersuchungen zur Expression und Funktion des Hsp60-spezifischen TZR	25
5.4	Gewebetypische Antigenprozessierung durch 20S-Proteasomen	26
6	Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Forschung	28
7	Literaturverzeichnis	32
7.1	Eigenzitate	32

1 Zusammenfassung der publizierten Forschungsergebnisse

1.1 Thematik

Autoimmunerkrankungen gehören zu den Leiden, deren Entstehung, Verlauf und Prognose in vielen Fällen heute noch ungeklärt sind und deren Inzidenzen in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen sind (1). Die meist konservativen und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten solcher Erkrankungen ist Ausdruck der noch weitgehend unverstandenen immunologischen Prozesse.

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, daß Mikroorganismen das Vorkommen und den Verlauf von Autoimmunprozessen wesentlich beeinflussen. Dies ist epidemiologisch dadurch belegt, daß eine wandernde Bevölkerung eine Prävalenz für Erkrankungen aufweist, die dem jeweiligen geographischen Breitengrad entspricht (2). Wie Mikroorganismen das Immunsystem beeinflussen, sei es durch Kreuzreaktivität zwischen Erreger- und Wirtsantigenen oder durch Störung immunregulatorischer Mechanismen, wird noch nicht verstanden.

Weitgehend unklar ist auch, warum Autoimmunphänomene oft in bestimmten Lebensabschnitten wie z.B. Pubertät, Schwangerschaft oder im fortgeschrittenen Alter auftreten und warum bestimmte Organe präferentiell vom Immunsystem angegriffen werden. Das Anliegen dieser Arbeit ist, verschiedene Mechanismen der Toleranzinduktion und Autoreaktivität bei $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten zu untersuchen und somit zum Verständnis autoimmuner Vorgänge beizutragen. Die Untersuchungen wurden in viralen und bakteriellen Infektionsmodellen durchgeführt. Da die $CD4^+$ T-Zellantwort gegen das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) und die mykobakterien-reaktiven $CD8^+$ T-Zellantwort gegen Hitzeschock-

protein 60 (Hsp60) nicht nur in-vitro sondern auch in-vivo untersucht werden konnten, eigneten sich beide Modelle für Toleranzstudien.

Zur Erleichterung der Lektüre werden in Abschnitt 2 grundlegende Fakten über verschiedene Toleranzmechanismen sowie über den themenrelevanten Kenntnisstand von Hitzeschockproteinen, Antigenpräsentation und Autoimmunität zusammengefaßt. Im Abschnitt 3 werden die neuentwickelten und experimentell überprüften Konzepte der organspezifischen Antigenprozessierung und diejenigen methodischen Grundlagen vorgestellt, die für das Verständnis wesentlich sind.

Im Abschnitt 4 werden die Ergebnisse beschrieben, die in VSV-G transgenen Tieren über allgemeine Toleranzmechanismen bei CD4⁺ T-Zellen gewonnen wurden. Neue Erkenntnisse über organspezifische Autoimmunität, die durch Hitzeschockprotein-kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellen verursacht werden, sind im Abschnitt 5 dargestellt. Abschnitt 6 faßt die Ergebnisse zusammen und ordnet sie in die aktuelle Autoimmunitätsforschung ein.

Der Leser wird in den Überschriften der Abschnitte durch Nummernangaben auf die relevanten Originalarbeiten des Autors verwiesen, welche im Abschnitt 7 unter diesen Nummern verzeichnet und im Kapitel II angefügt wurden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Toleranzmechanismen

2.1.1 Zentrale Toleranz

Die Induktion und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz in einem sich entwickelnden und reifen Immunsystem (T-Zellsystem) wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen gewährleistet, die im Thymus aber auch im peripheren lymphoiden und nicht-lymphoiden Gewebe stattfinden. Für das heranreifende Immunsystem ist der Thymus das Zentralorgan, in dem T-Zellen, sobald sie einen funktionellen T-Zellrezeptor exprimieren, einer ersten Kontrolle auf potentielle Selbstreaktivität unterzogen werden. Werden während dieser frühen Entwicklungsphase Selbstantigene mit einer hohen Avidität erkannt, so führt dies zum apoptotischen Zelltod von unreifen Thymozyten (3, 4). Dieser Prozess wird als negative Selektion bezeichnet. Antigen-spezifische, zentrale Toleranz erfordert, daß ein entsprechendes Selbstantigen entweder direkt im Thymus exprimiert wird oder über die Blut- bzw. Lymphzirkulation dorthin gelangt (5). T-Zellen erkennen kein intaktes Protein sondern prozessierte Peptidfragmente, die an MHC-Moleküle gebunden sind. Deshalb stellt die Effizienz der Antigenprozessierung und -präsentation von Zellen im Thymus einen limitierenden Faktor in der Verfügbarkeit von Selbstantigen dar. Es ist heute weitgehend akzeptiert, daß im Thymus T-Zelltoleranz gegen ubiquitär vorkommende Zelloberflächenantigene, Serumkomponenten oder Proteine des allgemeinen Zellstoffwechsels erzeugt wird (6). Unklar ist jedoch, wie Selbsttoleranz gegen Proteine, die nur während bestimmter Entwicklungsstadien, oder nur in bestimmten Organen vorkommen, entsteht.

2.1.2 Periphere Toleranz

Die Entstehung von Toleranz gegen gewebespezifische Antigene wurde in zahlreichen Studien untersucht. Da die Frequenz autoreaktiver T-Zellen in einem normalen polyklonalen T-Zellrepertoire sehr niedrig ist ($1/10^4 - 1/10^6$ Zellen), wurden solche Untersuchungen erst mit der Generierung von T-Zellrezeptor (TZR) transgenen Tieren möglich. Ein großer Teil der T-Zellen exprimiert einen TZR mit definierter Spezifität, wodurch diese Zellen leicht verfolgt und analysiert werden können. Untersuchungen an transgenen Tieren, die ein Neoselbstantigen und einen dafür spezifischen, transgenen TZR gleichzeitig exprimierten, zeigten, daß das Vorkommen potentiell selbstreaktiver T-Zellen in der Peripherie nicht automatisch mit Autoimmunpathologie gleichgesetzt werden kann (7). Stattdessen scheinen verschiedene, sich gegenseitig nicht ausschließende Toleranzmechanismen in der Peripherie zu wirken, die die immunologische Integrität des Organismus sichern. Folgende Mechanismen werden derzeit diskutiert.

2.1.3 Periphere Deletion

In Analogie zur negativen Selektion im Thymus konnte durch adoptiven Transfer von naiven, antigenspezifischen T-Zellen gezeigt werden, daß diese nach Kontakt mit dem Selbstantigen auch in der Peripherie deletiert werden. Vor ihrer Eliminierung kam es jedoch zu einer starken Proliferation ohne Entstehung einer Gewebeschädigung (8, 9). Auch dort wo Selbstantigene nicht ubiquitär, sondern nur in bestimmten Gewebe exprimiert werden, wurde periphere Deletion beobachtet. Es stellte sich heraus, daß das Selbstantigen vom Ursprungsgewebe freigesetzt und im drainierenden Lymphknoten präsentiert wird (10). Interessanterweise war diese Route der Antigenfreisetzung und

Präsentation nicht nur auf CD4⁺ T-Zellepitope beschränkt, sondern wurde auch bei CD8⁺ T-Zellepitopen beobachtet (11, 12).

2.1.4 Ignoranz

Ignoranz beschreibt die Koexistenz von naiven, autoreaktiven T-Zellen bei gleichzeitigem Vorkommen eines entsprechenden Selbstantigens in der Peripherie (13). Ignoranz ist ein "passiver Toleranzmechanismus", der eine räumliche Trennung von Antigen und potentiell autoreaktiven T-Zellen beschreibt (7). Normalerweise zirkulieren naive T-Zellen im Blut- und Lymphstrom und verlassen das Gefäßsystem nicht. Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. einer Infektion oder Immunisierung, können solche T-Zellen jedoch aktiviert werden und dabei Gewebeschädigungen verursachen. Damit birgt diese Form der Toleranz die Gefahr, daß potentiell autoreaktive T-Zellen durch molekulares Mimikry (homologe Strukturen zwischen Pathogen und dem Wirtsorganismus) aktiviert werden und Infektionen zum Auslöser von Autoimmunität werden (14).

2.1.5 Anergie

Das "Zwei-Signal-Modell" besagt, daß naive T- und B-Zellen nur dann vollständig aktiviert werden, wenn neben dem ersten Signal, der Stimulation durch den spezifischen Antigenrezeptor ein zweites Signal durch kostimulatorische Moleküle erfolgt (15, 16). Die erste Beschreibung eines kostimulatorischen Signals war die Bindung von CD28 an den B7 Liganden. Inzwischen wurden weitere kostimulatorische Moleküle beschrieben, zu denen auch Zytokine gehören (17). Erfährt ein Lymphozyt eine Stimulation

ausschließlich über seinen Antigenrezeptor, so ist dies nicht nur ein unvollständiges Stimulationssignal, sondern führt zu einer funktionellen Inaktivierung der Zellen. Dieser Zustand wird als Anergie bezeichnet. Hieraus wird ersichtlich, daß die Umgebung in der ein bestimmtes Antigen erkannt wird, entscheidend für die Stimulation oder Anergisierung eines naiven Lymphozyten ist. Man nimmt heute an, daß unter physiologischen Bedingungen nur professionelle antigenpräsentierende Zellen, besonders die Dendritischen Zellen, in der Lage sind gleichzeitig beide Signale zu übermitteln. Dendritische Zellen werden durch Botenstoffe (Chemo- und Zytokine) des angeborenen Immunsystems zu einem Infektionsherd gelockt, nehmen dort Antigen auf und wandern anschließend in die regionalen Lymphknoten, wo sie T-Zellen aktivieren (18). Deshalb sollte Antigenkontakt in einem Gewebe, in dem kein inflammatorisches Zytokinmilieu herrscht oder kostimulatorische Moleküle fehlen, zu einer Anergisierung von T-Zellen führen. Anergie T-Zellen wurden aber auch nach chronischer Antigenstimulation beobachtet. Zellen, die nicht durch Apoptose eliminiert wurden, stellen nach Antigenstimulation die Proliferation ein und produzieren das immunsuppressiv wirkende Interleukin 10 (8, 19). Deshalb betrachtet man anerge T-Zellen nicht als vollständig paralytisch, sondern als T-Zellen, die statt ihrer Effektorfunktion eine regulatorische Funktion übernommen haben (20). Es muss jedoch erwähnt werden, daß die molekulare Charakterisierung von Anergie der funktionellen Definition hinterherhinkt.

2.2 Regulatorische T-Zellen

Die Existenz sogenannter Suppressor-T-Zellen war über viele Jahre hinweg Gegenstand einer zum Teil hitzigen Debatte. Das Konzept regulatorischer T-Zellen erfuhr jedoch

kürzlich eine Renaissance; mehrere Gruppen haben unabhängig voneinander gezeigt, daß thymus-abhängige T-Zellen die Effektorfunktion von sogenannten konventionellen T-Zellen in vitro und in vivo modulieren können (21, 22). Beeindruckend sind die Experimente, bei denen durch Transfer von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen die Entstehung einer Autoimmunpathologie verhindert werden konnte (23). Die Differenzierung wie auch die Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen ist bisher noch weitgehend unklar. Diskutiert wird derzeit, ob regulatorische T-Zellen ihre Wirkung über direkten Zell-Zellkontakt oder über die Sekretion von löslichen, antiinflammatorischer Zytokinen wie z.B. Interleukin 10 oder TGF-β (Transforming growth factor) ausüben.

2.3 Hitzeschockproteine und Autoimmunität

Hitzeschockproteine (Hsp), auch Stressproteine genannt, sind eine Familie hochkonservierter Moleküle, die zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden Proteinen gehören und nach ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Funktion klassifiziert werden. Die meisten Hsp üben sogenannte Chaperone-Funktionen aus, d. h. sie interagieren transient mit anderen Proteinen, um deren Zusammenbau, Faltung oder Transport innerhalb der Zelle zu unterstützen (24). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß Hsp wie GP96, Hsp70 und Hsp90 auch direkt mit Peptiden interagieren und somit an dem intrazellulären Antigentransport bzw. an der Antigenprozessierung teilnehmen (25). Obwohl Hsp intrazelluläre Proteine sind, gibt es Hinweise, daß Hsp auch auf der Zelloberfläche von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen exprimiert werden. So rufen Tumore eine Hsp-spezifische Immunantwort hervor, und eukaryotisches wie auch bakterielles Hsp 60 stimulieren über CD14, einem auf Dendritischen Zellen und

Makrophagen vorkommenden Oberflächenrezeptor für mikrobielle Antigene, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch mononukleäre Zellen (26).

Stressfaktoren, wie Infektionen, Entzündungen etc. sind Auslöser einer erhöhten Produktion von Hsp, zum Schutz der davon betroffenen Zellen bzw. eines Organismus. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß bei vielen Infektionen und Autoimmunerkrankungen Hsp dominante Antigene der zellulären und humoralen Immunantwort sind (27). Man nimmt an, daß durch die große strukturelle Homologie zwischen mikrobiellem und Säuger-Hsp, kreuzreaktive T- und B-Zellen aktiviert werden. Diese können in verstärktem Maße bei chronischen Entzündungsreaktionen bzw. Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden. Ob Hsp-spezifische Immunantworten jedoch direkte Auslöser oder nur Begleiterscheinungen solcher Erkrankungen sind, kann in vielen Fällen nicht beantwortet werden. Gegen einen grundsätzlichen Zusammenhang zwischen Hsp-Reaktivität und Autoimmunität spricht die Tatsache, daß selbst bei gesunden Personen Hsp-kreuzreaktive T- und B-Zellen nachgewiesen werden können. Man geht davon aus, daß diese durch kommensale Mikroorganismen in unserem Körper stimuliert werden. Überzeugende Belege für einen kausalen Zusammenhang zwischen Hsp-spezifischer Immunantwort und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen stammen von zwei Tiermodellen, der Adjuvanz induzierten Arthritis bei Ratten und dem Diabetes in NOD Mäusen (28). In beiden Fällen konnte durch Transfer von Hsp 60-spezifischen CD4⁺ T-Zellen die Krankheit in naiven Tieren induziert oder beschleunigt werden (29, 30). Ratten, die mit den entsprechenden Peptiden immunisiert wurden, entwickelten keine Arthritis und NOD-Mäuse wurden vor der Entstehung eines spontanen Diabetes geschützt (31, 32). Ob die Autoimmunpathologie direkt durch Hsp-kreuzreaktive T-Zellen ausgelöst wird, kann auch in diesen Fällen nicht zweifelsfrei gesagt werden, da bekannt ist, daß T-Zellen auch mit Peptiden geringer Homologie

kreuzreagieren. Es konnte zudem nicht geklärt werden, ob solche Selbstantigene auch direkt von den Zellen eines betroffenen Gewebes prozessiert werden. Dieser Fragestellung nachzugehen, ist ein besonderes Anliegen dieser Arbeit.

2.4 Antigenprozessierung durch das proteasomale System

Die meisten antigenen Peptide, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden, stammen von zytosolischen Proteinen (endogene Antigene) ab, die von Zellen selbst synthetisiert wurden (33). Der genaue Regulationsmechanismus des Abbaus zellulärer Proteine durch zytosolische Proteasen und damit der Produktion antigenen Peptide, ist noch weitgehend unbekannt.

Obwohl viele Proteasen am Abbau intrazellulärer Proteine beteiligt sind, ist das Proteasom der wichtigste zytosolische Proteasekomplex durch den antigenen Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 8-16 Aminosäuren generiert werden. Wenn solche Abbauprodukte einen hydrophoben C-terminalen Rest aufweisen, gelangen sie mit Hilfe sogenannter Transportermoleküle (TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER). Im ER können diese Peptide entweder direkt an MHC Klasse I Moleküle binden oder werden dort N-terminal auf ihre endgültige Länge gekürzt, ein Prozess der als Trimming bezeichnet wird (34, 35).

Die proteolytische Aktivität ist im 20S-Proteasom lokalisiert, einem multimeren Enzymkomplex, der aus vier zylinderförmig zusammengesetzten Ringen besteht. Die beiden äußeren Ringe setzen sich aus zwei α -Ketten und die inneren Ringe aus zwei β -Ketten zusammen, die ihrerseits jeweils aus sieben Untereinheiten, α 1- α 7 und β 1- β 7, bestehen. Während die α 4 und α 6 -Untereinheiten mit den Proteasomenregulatoren PA700 und PA28 aber auch mit Proteinen viralen und zellulären Ursprungs

interagieren, geht man davon aus, daß die katalytische Aktivität durch die drei β -Untereinheiten, $\beta 1$, $\beta 5$ und $\beta 2$ bestimmt wird (36). Durch Stimulation mit Interferon- γ werden diese drei konstitutiven Untereinheiten gegen die induzierbaren Untereinheiten, $i\beta 1$ (LMP2), $i\beta 5$ (LMP7) und $i\beta 2$ (MECL-1) ausgetauscht und bilden so das Immunoproteasom. Aus Untersuchungen mit Zelllinien ist bekannt, daß das Muster der Peptidfragmente vom Gehalt der Immunoproteasomen abhängt, nicht aber die Effizienz, mit der T-Zellepitope prozessiert werden (37). Im Gegensatz dazu ist der Einfluß der proteasomalen α -Untereinheiten auf die Antigenprozessierung bisher noch nicht erforscht.

3 Methodische Grundlagen und Neuentwicklungen

3.1 Die VSV-Glykoprotein (VSV-G) spezifische Immunantwort

Im Modell der Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) wurde untersucht, welchen Einfluß die Struktur, die Lokalisation und die Expression eines Antigens auf die Toleranzinduktion von $CD4^+$ T-Zellen hat.

Im Glykoprotein von VSV befinden sich die biologisch relevanten Epitope, die von neutralisierenden Antikörpern und $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden. Letztere werden für den Klassenwechsel der B-Zellen von IgM nach IgG benötigt. Die protektive Immunantwort gegen eine VSV Infektion ist biphasisch, d.h. sie besteht aus einer frühen IgM Antikörperantwort, die von $CD4^+$ T-Zellen unabhängig ist und einer darauf folgenden Antikörperantwort des IgG Typs, die jedoch strikt von $CD4^+$ T-Zellen abhängt (38).

Die VSV-G spezifische B- und T-Zellantwort wurde in verschiedenen transgenen Tieren

analysiert, die VSV-G als Neoselbstantigen in unterschiedlichen Formen (löslich oder membranständig), zu verschiedenen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Organen exprimieren. Die VSV-G spezifische CD4⁺ T-Zellaktivität wurde entweder indirekt über den spezifischen IgG Antikörpertiter oder direkt durch die Analyse von TZR transgenen Tieren bestimmt. Hierzu wurden die Tiere entweder mit VSV Serotyp Indiana, VSV-G rekombinanten Vaccinia Viren, oder mit VSV-G, das an Myoglobin gekoppelt war, immunisiert.

3.2 Die Hsp60-spezifische Immunantwort

Es ist bekannt, daß Infektionen mit unterschiedlichen Erregern Hsp60-spezifische T- und B-Zellimmunantworten induzieren (39). Gleichzeitig mehrt sich der Verdacht, daß Hsp60-spezifische Immunantworten nicht nur schützende, sondern auch schädigende Auswirkungen haben. Es ist bis heute jedoch unklar, ob Erkrankungen bei denen sich eine signifikant erhöhte Reaktivität gegen Hsp60 nachweisen läßt, direkt durch die Hsp-spezifische Immunantwort ausgelöst wurde, oder diese nur als Begleiterscheinung einer anderweitig verursachten Gewebeschädigung auftritt. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir CD8⁺ T-Zellen, die durch bakterielles Hsp60 induziert wurden, in-vitro und in-vivo auf Kreuzreaktivität mit dem eukaryotischen Homolog untersucht. So konnte neben der Feinspezifität auch das pathologische Potential dieser Zellen untersucht werden. Durch adoptiven Transfer von Hsp60-kreuzreaktiven CD8⁺ T-Zellen in α/β T-zelldefiziente Tiere wurde das Verhalten der T-Zellen und die Entstehung der Immunpathologie direkt im lebenden Organismus verfolgt. Da die Hsp60-reaktiven CD8⁺ T-Zellen eine gewebespezifische Entzündungsreaktion im Dünndarm verursachten, wurden anschließend verschiedene Gewebe hinsichtlich der

Prozessierungsfähigkeit von MHC-Klasse I Antigenen untersucht. An dieser Stelle sei auf die in den Originalarbeiten beschriebenen neuen Systeme zur Analyse einer gewebespezifischen Entzündungsreaktion und Antigenprozessierung verwiesen.

3.3 Organspezifische Antigenprozessierung durch das 20S Proteasom

Man geht heute davon aus, daß der größte Teil der auf MHC Klasse I präsentierten Peptide durch das proteasomale System entstanden sind. Da diese Untersuchungen meist mit Zelllinien durchgeführt wurden, gibt es bisher keine Kenntnisse über die proteasomalen Prozessierungseigenschaften, komplexer Gewebe bzw. Organe. Da das physiologische Milieu im Gewebe einen starken Einfluß auf die Proteasomenzusammensetzung und somit auch auf die Prozessierungseigenschaften einzelner Zellen hat, interessierte uns die Frage, in wie weit sich verschiedene Gewebe bzw. Organe in ihrem Prozessierungsverhalten unterscheiden. Hierzu wurden 20S Proteasomen aus verschiedenen Organen isoliert und mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese in die einzelnen Untereinheiten aufgetrennt. Dabei wurde deutlich, daß jedes Organ ein ganz spezifisches Proteinmuster von α - und β Untereinheiten der 20S Proteasomen aufweist. Unabhängige Versuche zeigten, daß das 2D-Proteinmuster organspezifisch reproduzierbar ist. Die Proteine wurden massenspektrometrisch (MALDI-MS) analysiert und mit Hilfe von Datenbanken identifiziert. Diese

Untersuchungen zeigten, daß proteasomale Untereinheiten in verschiedenen Isoformen vorkommen, die wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikationen entstanden sind. Die Prozessierungseigenschaften isolierter 20S-Proteasomen wurden in einem In-vitro-Verdausystem mit verschiedenen Modellsubstraten (30mer Polypeptide) getestet. Die dabei entstandenen Spaltprodukte wurden mit Hilfe der MALDI-MS identifiziert.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß 20S Proteasomen verschiedener Organe unterschiedliche Spaltprodukte erzeugen.

3.4 Die T-Zellrezeptoranalyse

Die Klonierung des T-Zellrezeptors (TZR) der Hsp60 kreuzreaktiven CD8⁺ T-Zellen ergab zwei Transkripte für den α -TZR (V α 8, V α 7) und ein Transkript für die β -Kette (V β 8). Die Kombination und Expression von zwei verschiedenen TZR- α Ketten mit einer TZR- β Kette wird als dualer TZR bezeichnet. Zur Klärung, ob die Expression eines dualen TZR für die Kreuzreaktivität der Hsp60-spezifischen T-Zellen verantwortlich gemacht werden können, wurden TZR-Transfektanten mit beiden TZR Kombinationsmöglichkeiten, V α 8/V β 8 und V α 7/V β 8 hergestellt. Die Transfektanten wurden dann auf die Oberflächenexpression der TZR und die spezifische Peptiderkennung analysiert. Hierzu wurden die V α 7, V α 8 und V β 8 Ketten in retrovirale Vektoren (pMSCV-IRES-GFP) kloniert, die grünfluoreszierendes Protein (GFP) als Reporter gen beherbergen. Eine TZR negative Thymomazelllinie (54 ζ 17-CD8) wurde dann mit den Vektoren der jeweiligen TZR-Kombinationen (V α 8/V β 8 und V α 7/V β 8) transduziert, um so die Expression und Reaktivität der einzelnen TZR analysieren zu können. Die Transduktion, die für alle drei TZR-Vektoren sehr effizient war, konnte direkt über die GFP-Expression mit dem fluoreszenzaktivierten Zellsorter (FACS) gemessen werden. Analysen der TZR-Expression mittels FACS und Westernblot zeigten, daß die V α 7 TZR-Kette im Zytoplasma, nicht aber an der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Spezifität der Peptiderkennung der Transfektanten wurde über die Sekretion von IL-2 und die Expression von CD69, einem frühen Aktivierungsmarker, gemessen.

4 Analyse autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen in VSV-G transgenen Tieren

Das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus enthält die biologisch relevanten Determinanten für die virusneutralisierenden Antikörper und für die VSV-G spezifischen CD4⁺ T-Zellen. VSV-G ist somit ein Antigen, mit dem B- und Helfer T-Zellantworten gleichermaßen untersucht werden können. Während Toleranzmechanismen bei CD8⁺ T-Zellen relativ gut untersucht sind, sind die der CD4⁺ T-Zellen noch schlecht charakterisiert. Deshalb führten wir hierzu Untersuchungen an verschiedenen VSV-G transgenen Tieren durch, die das virale Neoantigen in unterschiedlicher Stärke und in verschiedenen Organen exprimieren.

4.1 Toleranzinduktion und Reaktivierung von VSV-G spezifischen CD4⁺ T-Zellen (1,2,3)

Die schützende, adaptive Immunantwort gegen eine Infektion mit VSV besteht aus neutralisierenden Antikörpern gegen das membranassoziierte Glykoprotein des Virus. Die biphasische, VSV-G spezifische Antikörperantwort umfaßt frühe, von CD4⁺ T-Zellen unabhängige IgM Antikörper, auf die eine langlebige IgG Antikörperantwort folgt. Im Gegensatz zu IgM Antikörpern ist letztere strikt von CD4⁺ T-Zellen abhängig. Die VSV-G spezifische CD4⁺ T-Zellantwort wurde in verschiedenen VSV-G transgenen Mauslinien (Linie 207 und 163), die das Glykoprotein in verschiedenen Organen exprimieren, untersucht. Während eine Immunisierung der transgenen Tiere mit gereinigtem VSV-G oder VSV-G rekombinanten Vakziniavirus (Vacc-G) keine spezifische IgG Antwort induzierte, wurden nach VSV-Infektion spezifische Autoantikörper des IgG Isotyps gebildet. Offensichtlich wird die Toleranz der VSV-G

spezifischen Helfer T-Zellen durch eine Infektion mit dem Wildtyp-VSV umgangen. Deshalb untersuchten wir mit Hilfe transgener Tiere die Frage, ob durch kovalente Kopplung neuer CD4⁺ T-Zelldeterminanten an VSV-G die spezifische T-Zelltoleranz umgangen werden kann und somit Autoantikörper vom IgG-Typ gebildet werden. Hierzu wurde rekombinant hergestelltes VSV-G kovalent an Spermwal-Myoglobin gekoppelt (VSV-G-SWM). Die Immunisierung von naiven C57BL/6 Mäusen ergab, daß freies VSV-G und VSV-G-SWM vergleichbare Immunogenität besitzen. Im nächsten Schritt wurden VSV-G transgene Tiere mit VSV-G-SWM oder dem Gemisch aus VSV-G und Myoglobin in Adjuvanz (CFA) immunisiert und anschließend die Antikörpertiter gemessen. VSV-G spezifisches IgG wurde in den transgenen Tieren nur nach Immunisierung mit kovalent gekoppeltem VSV-G-SWM aber nicht durch Koinjektion ungekoppelter Antigene induziert. Im Gegensatz zur VSV Infektion, konnte VSV-G spezifisches IgG erst 20 Tage nach VSV-G-SWM Immunisierung nachgewiesen werden. Der maximale Antikörpertiter war aber bei beiden Immunisierungsformen gleich. Wie zu erwarten, konnte durch die Primärimmunisierung mit freiem SWM und nachfolgender Immunisierung mit dem VSV-G-SWM Komplex der spezifische IgG Titer nicht erhöht werden.

Diese Experimente zeigen, daß die Aktivität autoreaktiver B-Zellen auf mehreren Ebenen kontrolliert wird. Ist ein Selbstantigen ubiquitär und in großen Mengen vorhanden, wird Toleranz durch klonale Eliminierung autoreaktiver B-Zellen gewährleistet (40). Ist das Antigen jedoch nur in geringeren Mengen vorhanden, so können B-Zellen anergisiert werden, d.h. trotz physischer Präsenz reagieren sie nicht mehr auf das entsprechende Autoantigen. Handelt es sich um ein seltenes Autoantigen, kann die Aktivität autoreaktiver B-Zellen auch durch fehlende T-Zellhilfe kontrolliert werden (41). Solche autoreaktiven B-Zellen lassen sich wieder aktivieren, wenn an das

Selbstantigen (hier: VSV-G) neue CD4⁺ T-Zell-determinanten (hier: SWM) gekoppelt werden. Damit ist die Aktivität von CD4⁺ T-Zellen auch für die Kontrolle von autoreaktiven B-Zellen entscheidend.

In weiteren Versuchen wurde der Frage nachgegangen, welcher Art die Toleranz der VSV-G spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den transgenen Tieren ist. Für diese Untersuchungen wurden VSV-G transgene Tiere (Linie: Monitor) verwendet, die das Neoselbstantigen in löslicher Form in der Leber, Niere und Lunge, nicht aber im Thymus exprimierten. Verschiedene Immunisierungsprotokolle (siehe oben) ergaben, daß auch in diesen transgenen Tieren die VSV-G-spezifischen B-Zellen normal und die CD4⁺ T-Zellen tolerant sind. Deshalb wurde untersucht, ob die Toleranz der CD4⁺ T-Zellen durch klonale Deletion oder durch Anergie verursacht wird. Hierzu wurden Milzzellen aus VSV-G transgenen Mäusen in immundefiziente Scid-Mäuse adoptiv transferiert und die Tiere sieben Tage später mit Vacc-G immunisiert. Es zeigte sich, daß diese Tiere eine normale VSV-G spezifische Immunantwort bildeten, die in Kinetik und im Titer mit der normaler C57BL/6 Mäusen vergleichbar war. Durch die letale Bestrahlung der Scid-Mäuse konnte ausgeschlossen werden, daß VSV-G spezifische Vorläuferzellen in einem antigenfreien Thymus heranreifen und als immunkompetente Zellen die Peripherie repopulieren. Weitere Transferexperimente verdeutlichten, daß die Toleranzinduktion von VSV-G spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie entsteht und es sich bei diesen Zellen um keine intermediäre Population handelt, die vor der klonalen Deletion steht.

Die Experimente mit VSV-G transgenen Tieren konnten zeigen:

A) Die Expression eines löslichen Neoselbstantigens (VSV-G) führt bei geringer Konzentration (100-1000 ng/ml) zur Toleranz von CD4⁺ T-Zellen, aber nicht der B-Zellen.

- B) Autoreaktive B-Zellen können durch Präsentation neuer CD4⁺ T-Zelldeterminanten, die mit dem B-Zellantigen direkt gekoppelt sind, zur Sekretion von IgG aktiviert werden.
- C) VSV-G spezifische CD4⁺ T-Zellen sind in den transgenen Tieren (Linie 163 und Monitor) anerg und können in antigenfreier Umgebung wieder reaktiviert werden.
- D) Anergie, VSV-G spezifische CD4⁺ T-Zellen weisen gegenüber normalen T-Zellen keine verkürzte Lebensspanne auf.

4.2 Variierende Toleranz bei entwicklungsabhängiger Expression von VSV-G (4)

Transgene Tiermodelle haben sehr viel zum Verständnis der Mechanismen von B- und T-Zelltoleranz beigetragen. Dabei wurde deutlich, daß die Form des Antigens (löslich vs. membrangebunden), die Antigenstruktur, Expressionstärke und der Expressionsort zentralen Einfluß auf die Art und den Mechanismus der Toleranzinduktion haben (42). Diese Untersuchungen wurden meist mit Modellantigenen durchgeführt, die eine entwicklungsunabhängige und gleichförmige Expression aufweisen. Da der Beginn einiger Autoimmunerkrankungen jedoch häufig mit hormonellen Umstellungen wie Pubertät, Schwangerschaft oder Menopause korreliert, sind Untersuchungen über Toleranzmechanismen bei hormonell bzw. entwicklungsregulierten Selbstantigenen von großer Bedeutung (43-46).

Um Toleranz bzw. Immunreaktivität gegen ein hormonell geregeltes Selbstantigen untersuchen zu können, wurde eine transgene Mauslinie (Linie 23) etabliert, die lösliches VSV-G unter der Kontrolle des hormonell induzierbaren β -Lactoglobulin-promoters exprimiert. Die Analyse dieser Tiere ergab, daß VSV-G in verschiedenen

Organen wie Brustdrüse, Milz, Lunge und Thymus sezerniert wird. Dabei stellte sich heraus, daß die VSV-G Expression im Thymus mit dem Alter variiert, d.h. kurz nach der Geburt sehr hoch ist und danach mit zunehmendem Lebensalter abnimmt. Entsprechend zeigte die Immunisierung der Linie 23 mit Vacc-G eine in den ersten 4 Lebenswochen deutlich reduzierte CD4⁺ T-Zellantwort, die sich bis zum Alter von 17 Wochen normalisierte und im fortgeschrittenen Alter (Woche 50) wieder drastisch verringert war. Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Aufnahme von VSV-G-haltiger Milch in der Frühphase der Tiere zu oraler Toleranz führt, da auch Jungtiere der Linie 23, die von nicht-transgenen Mäusen gesäugt wurden, tolerant waren. Um den Toleranzmechanismus besser zu verstehen, wurde die Linie 23 mit Tieren gekreuzt, die einen VSV-G transgenen T-Zellrezeptor (V 4/V 2) exprimieren (Linie 7). Vergleicht man den Prozentsatz der TZR-transgenen, V 2 positiven CD4⁺ T-Zellen der Linie 7 mit dem der doppeltransgenen Linie 23x7, so fällt auf, daß bei gleichzeitiger Expression des Antigens und des spezifischen TZR's die VSV-G spezifischen CD4⁺ T-Zellen deutlich verringert sind. Interessanterweise nimmt der Anteil der TZR-transgenen T-Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere wieder zu und bleibt dann ab der 15. Woche über den ganzen Analysezeitraum konstant. Dieser Befund macht deutlich, daß unterschiedliche Toleranzmechanismen die entwicklungsabhängige, VSV-G spezifische T-Zellaktivität kontrollieren. Während die frühe Toleranzphase durch klonale Deletion selbstreaktiver CD4⁺ T-Zellen im Thymus erfolgt, muß ein zusätzlicher, peripherer Mechanismus die Aktivität dieser T-Zellen im fortgeschrittenen Lebensalter kontrollieren. Obwohl Akkaraju et al. in einem Hühnereilysozym-transgenen Tiermodell bereits zeigen konnte, daß selbstreaktive CD4⁺ T-Zellen durch ein ganzes Spektrum von Toleranzmechanismen kontrolliert werden können (47), handelt es sich hier um eine entwicklungsabhängige Toleranzentstehung, bei der durch hormonelle Regulation eines

Selbstantigens die Aktivität von CD4⁺ T-Zellen durch unterschiedliche Mechanismen kontrolliert wird.

5 Hitzeschockprotein-kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellen und Autoimmunität

Hitzeschockproteine (Hsp) sind hochkonservierte und ubiquitär vorkommende Proteine, die wichtige Funktionen bei der Proteinfaltung, dem Zusammenbau von makromolekularen Komplexen und der Translokation von Proteinen in verschiedene Zellkompartimente übernehmen. Gleichzeitig sind Hsp aber auch dominante Antigene bei vielen Infektions- und Autoimmunerkrankungen, die humorale und zelluläre Immunantworten hervorrufen. Dabei fördert die häufig beobachtete Sequenzähnlichkeit von Hsp verschiedener Spezies die Bildung von kreuzreaktiven T- und B-Zellen. In diesem Abschnitt widmen wir uns der Frage, welche immunpathologischen Konsequenzen eine Hsp60-kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellantwort haben kann.

5.1 Bakterien Hsp60 induzierte CD8⁺ T-Zellen reagieren mit murinem Homolog (5,6)

Hsp60 kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellen wurden *in vitro* durch Stimulation von naiven Milzzellen mit tryptisch verdaulichem mykobakteriellen Hsp60 generiert. Diese CD8⁺ T-Zellen lysierten Interferon- γ (IFN- γ) stimulierte Zielzellen auch in Abwesenheit von mykobakteriellen Hsp60 Peptiden. Dabei war unklar, ob die Stimulation mit IFN- γ zu einer erhöhten Synthese und Präsentation von endogenem Hsp60 führte, oder ob durch die pleiotrope Wirkung von IFN- γ Proteine induziert werden, mit denen Hsp60-spezifische CD8⁺ T-Zellen kreuzreagieren. Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst auf Proteinebene gezeigt, daß eine Stimulation von

Knochenmarksmakrophagen mit 500U/ml rekombinanten IFN- γ genauso wie eine Hitzebehandlung mit 42°C bzw. 44°C zu einer verstärkten Hsp60 Synthese führt. Um zu zeigen, daß Hsp60 das Zielantigen der kreuzreaktiven CD8⁺ T-Zellen ist, entwickelten wir ein Hsp60-spezifisches, mit Schwefelphosphat modifiziertes Antisense-Oligonukleotid (A-ODN). Dieses wurde von eukaryotischen Zellen (Schwann-Zellen und Makrophagen) effizient aufgenommen und blockierte die Neusynthese von Hsp60. Im Funktionstest (⁵¹Cr-Freisetzungsversuch) konnte schließlich gezeigt werden, daß IFN- γ stimulierte Knochenmarksmakrophagen, die zuvor mit A-ODN behandelt wurden, nur noch marginal von den Hsp60-spezifischen CD8⁺ T-Zellen lysiert werden. Zur Vergewisserung, daß die A-ODN-Behandlung keine unspezifischen Effekte hat, wurden diese zusammen mit Hsp60-spezifischen Sense-Oligonukleotiden (S-ODN) zusätzlich noch in einem Virus-spezifischen (MCMV) Zytotoxizitätsassay kontrolliert. In beiden Fällen waren keine unerwünschten Nebeneffekte durch die A-ODN zu beobachten. Diese Versuche zeigten deutlich, daß mykobakterien-Hsp60 induzierte CD8⁺ T-Zellen mit dem eukaryotischen Homolog kreuzreagieren und somit von diesen Zellen die Gefahr einer Autoimmunpathologie ausgeht.

5.2 Immunpathologie durch Hsp60 reaktive CD8⁺ T-Zellen (7)

Eine Reihe von Untersuchungen deuten darauf hin, daß Hsp-spezifische Immunreaktionen Auslöser von Autoimmunerkrankungen sein können (Review Kaufmann). Obwohl bei diesen Erkrankungen häufig eine hohe Frequenz von Hsp-reaktiven T- und B-Zellen nachgewiesen werden kann, ist in den meisten Fällen jedoch unklar, ob sie durch eine unkontrollierte Hsp-Reaktivität ausgelöst wurden, oder ob sie

die Folgeerscheinung einer vorangegangenen Gewebeerstörung sind, bei der es zu einer erhöhten Synthese bzw. Freisetzung von Hsp kam. Dieser Frage sind wir in einem Tiermodell wie folgt nachgegangen:

Ein Hsp60-kreuzreaktiver CD8⁺ T-Zellklon (UZ3/4), der in vitro mit definierten Peptiden des mykobakteriellen und murinen Hsp60 reagierte, wurde in α/β T-zelldefiziente (β -TZR^{-/-}) Tiere adoptiv transferiert. Dieses Tiermodell ermöglichte somit die Migration und Expansion des kreuzreaktiven T-Zellklons in-vivo direkt zu verfolgen. Ungefähr 2-5 Wochen nach T-Zelltransfer erkrankten die Tiere sichtbar an einer schweren Entzündung des Dünndarms. Der Dickdarm hingegen blieb stets unauffällig. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, daß die erkrankten Tiere massive Infiltrationen von Hsp60-spezifischen T-Zellen in der Lamina propria und dem Darmepithel aufweisen, die zu einer progredienten Zerstörung der mukosalen Barriere führte. Die Entzündungsreaktion war antigenspezifisch und MHC- Klasse I restringiert, da ein Influenzanukleoprotein-reaktiver CD8⁺ T-Zellklon mit einer identischer MHC-Restriktion (H-2D^b) und einem Typ I Zytokinmuster (IFN- γ und TNF- α) keine immunpathologischen Veränderungen in β -TZR^{-/-} Tieren verursachte. Wie im Modell der durch CD4⁺ T-Zellen induzierten Colitis scheint TNF- α auch hier eine essentielle Rolle beim Entzündungsgeschehen zu spielen ⁴⁸. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Colitis-Tiermodellen, ist die Entstehung der Dünndarmopathie in unserem Modell unabhängig von der bakteriellen Flora, da auch keimfreie Tiere eine Entzündung des Dünndarms entwickelten. Somit konnten wir klar demonstrieren, daß Hsp60-kreuzreaktive CD8⁺ T-Zellen murines Hsp60 auch in-vivo erkennen. Interessanterweise zeigten Westernblotanalysen, daß im Dünndarm wesentlich weniger endogenes Hsp60 exprimiert wird als im Dickdarm, einem Gewebe wo keine immunpathologischen Veränderungen auftraten. Da die Dünndarmopathie weder

durch eine spezielle Gewebeaffinität (Homing) noch durch eine erhöhte Expression von MHC-Klasse I Molekülen im Dünndarm erklärt werden konnte, stellten wir die Hypothese auf, daß die proteasomale Prozessierung von MHC-Klasse I Antigenen gewebetypische Unterschiede aufweist.

5.3 Untersuchungen zur Expression und Funktion des Hsp60-spezifischen TZR (8)

Durch die Klonierung des TZR von UZ3/4 wurden zwei im Leseraster rearrangierte TZR α Gene und ein TZR β Gen identifiziert. Das β -Ketten Rearrangement war V β 8.1-D β 1-J β 1.1 und das Rerrangement für den α -Lokus war V α 8.2-J42 und V α 7.2-J18. Da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der Expression eines dualen T-Zellrezeptors und der Autoreaktivität von T-Zellen diskutiert wird, sind wir der Frage nachgegangen, ob die Kreuzreaktivität von UZ3/4 durch die Expression eines dualen TZR bedingt ist. Um beide TZR-Kombinationen (V α 8/V β 8 und V α 7/V β 8) einzeln analysieren zu können, wurden Transfektanten hergestellt, die entweder die TZR-Kombination V α 8/V β 8 oder V α 7/V β 8 exprimierten. Hierzu wurde die cDNA der TZR in einen retroviralen Vektor kloniert, der grünfluoreszierendes Protein (GFP) als Markerprotein enthält. Die Expression von GFP ist somit ein direktes Maß für die Transduktionseffizienz, die für beide TZR-Kombinationen bei ca. 30-45% lag. Da es für V α 7 keinen TZR-spezifischen Antikörper gab, konnte die Oberflächenexpression des TZR V α 7/V β 8 nur indirekt über die Expression von V β 8 gemessen werden. Im Gegensatz zu den TZR V α 8/V β 8-Transfektanten, konnte trotz hoher GFP-Expression bei den TZR V α 7/V β 8 Transfektanten keine Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Westernblotanalysen, die mit Antikörpern gegen den konstanten Teil der α -

Kette durchgeführt wurden, zeigten jedoch bei beiden Transfektanten ein klares Signal, was auf eine ausschließlich intrazytoplasmatische Expression und Lokalisation der V α 7 Kette schließen läßt. Ob die V α 7 Kette generell, oder nur spezifisch mit der TZR V β 8.1 Kette nicht paaren kann, ist zur Zeit noch unbekannt.

Dieser Befund deutete darauf hin, daß für die Kreuzreaktivität von UZ3/4 die Expression eines TZR ausreichend ist. Dies wurde experimentell auch bestätigt, da eine Stimulation der TZR V α 8/V β 8 Transfektanten mit mykobakteriellen und murinen Hsp60 Peptiden zu einer Expression des frühen T-Zellaktivierungsmarkers, CD69, führte. Entsprechend war auch die Inkubation mit Antikörpern gegen V α 8.2 ausreichend, um im Zytolyseassay die Erkennung beider Peptide durch UZ3/4 zu blockieren.

Das bereits schon früher beschriebene Phänomen der promiskuen Peptiderkennung macht deutlich, daß auch der TZR V α 8.2/V β 8.1 in der Lage ist, in-vitro mit Peptiden von nur sehr geringer Homologie zu reagieren und in vivo Autoimmunpathologie zu erzeugen.

5.4 Gewebetypische Antigenprozessierung durch 20S-Proteasomen (9)

Die meisten auf MHC-Klasse I Molekülen präsentierten Peptide werden durch das 26S-Proteasomensystem generiert. Die proteolytisch aktiven Zentren befinden sich dabei im 20S-Kernkomplex, den wir in dieser Arbeit genauer analysiert haben.

20S Proteasomen wurden aus verschiedenen Geweben isoliert und mittels der 2D-Gelelektrophorese in die verschiedenen Untereinheiten aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Resultate demonstrierten, daß verschiedene Gewebe sich nicht nur im Gehalt der Immunoproteasomenuntereinheiten i β 1 (LMP2),

iβ2 (MECL-1) und iβ5 (LMP7) unterscheiden, sondern auch ein distinktes Muster der α-Untereinheiten, besonders jedoch der α4 und α6 Untereinheiten, aufweisen. Die genauen Muster der 20S- Proteasomen sind der Publikation zu entnehmen.

Von großem Interesse war die Frage, welchen Einfluß die gewebetypischen Unterschiede der 20S-Proteasomen auf die Prozessierung von Peptiden bzw. T-Zellepitope haben. Hierzu wurden verschiedene 25-30 Aminosäuren umfassende Modellsubstrate in vitro durch 20S-Proteasomen verdaut und die entstandenen Spaltprodukte massenspektrometrisch analysiert. Die mehrfach durchgeführten Analysen demonstrierten, daß die aus verschiedenen Organen stammenden 20S-Proteasomen ein quantitativ und qualitativ unterschiedliches Peptidmuster generierten. Mit der in 5.2 beobachteten Immunpathologie des Dünndarms korrelierend, zeigten in vitro Verdaus, daß das murine Hsp60 T-Zellepitop (KDIGNIISDA) am effizientesten von 20S-Proteasomen aus dem Dünndarm gespalten wurde. Im Gegensatz dazu generierten 20S Proteasomen des Colons das T-Zellepitop nur sehr marginal. Da die massenspektrometrisch ermittelten Mengen an Spaltprodukten nur von relativer Aussagekraft sind, haben wir die in vitro generierten Peptide des murinen Hsp60 auch funktionell in einem ⁵¹Cr-Freisetzungssassay mit dem Hsp60-spezifischen T-Zellklon getestet. Die Ergebnisse machten deutlich, daß nur die Proteasomen des Dünndarms in der Lage sind das Hsp60 T-Zellepitop in einer Menge zu generieren, die für eine spezifische Erkennung durch die Hsp60-spezifischen T-Zellen notwendig ist. Dieser Befund legt nahe, daß die organspezifischen Unterschiede von 20S Proteasomen auch von biologischer Bedeutung sind.

6 Einordnung der Ergebnisse in die gegenwärtige Forschung

Selbsttoleranz ist eine elementare Eigenschaft des Immunsystems, die primär durch die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus gewährleistet wird. Neben diesem als zentrale Toleranz bezeichneten Mechanismus, verfügt ein Organismus gleichzeitig über periphere Toleranzmechanismen, da nicht jede potentiell selbstreaktive T-Zelle im Thymus eliminiert werden kann und darf. Dies ergibt sich bereits aus folgender theoretischen Überlegungen: Nimmt man an, daß das Immunsystem über ein fast uneingeschränktes Rezeptorrepertoire verfügt, so sind autoreaktive T- und B-Zellen zu erwarten. Da die Abwehr von Infektionserregern eine zentrale Aufgabe des Immunsystems ist, viele Erregerantigene jedoch ähnlich oder identisch mit denen des Wirtsorganismus sind, würde eine vollständige Eliminierung von Selbstreaktivität zu Löchern im Immunrepertoire führen. Solche Löcher sind jedoch nicht bekannt. Im Gegenteil, die Aktivierung von selbstreaktiven Lymphozyten zur Abwehr von Mikroorganismen könnte sogar einen Vorteil für den Wirtsorganismus darstellen. Wie kann jedoch unter diesen Voraussetzungen eine Autoimmunpathologie verhindert werden? Hierzu muß grundlegend geklärt werden, daß Autoreaktivität nicht gleich Autoimmunerkrankung bedeutet. Man findet in der Literatur deshalb häufig die Unterscheidung zwischen einer physiologischen, gutartigen Autoimmunität und einer pathogenen Autoimmunität, die zur Schädigung des Organismus führt (49). Die meisten selbstreaktiven T-Zellen in der Peripherie haben eine geringe Affinität und stellen dadurch für den Organismus keine direkte Gefährdung dar. Dennoch entkommen nach Schätzungen von Kisielow und Boehmer ca. 3-5% hochaffine, autoreaktive T-Zellen der klonalen Deletion im Thymus und sind Bestandteil des reifen T-Zellrepertoires. Selbst diese T-Zellen verursachen normalerweise keine Autoimmunpathologie⁵⁰. Man ist

davon ausgegangen, daß naive (autoreaktive) T-Zellen, die den Selektionsprozess im Thymus überlebt haben, in den sekundären lymphoiden Organen in einem sogenannten Ruhezustand persistieren, ohne im ständigen Kontakt mit dem Selbstantigen zu stehen. Neuere Untersuchungen mit mutanten Tieren, die MHC Klasse II Moleküle nur im Thymus exprimieren oder Transferexperimente mit H-Y-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in MHC Klasse I defiziente Tiere bestätigen diese Ansicht jedoch nicht. Diese Experimente zeigten, daß ein geringes Maß an MHC-restringierter Selbstantigenerkennung und Signale, die im Gegensatz zu einer konventionellen Antigenerkennung keine Proliferation induzieren, für das Überleben von autoreaktiven T-Zellen notwendig sind⁵¹⁻⁵³.

Ob T-Zellen mit einem (Selbst)antigen reagieren, hängt nicht nur von der Frequenz dieser Lymphozyten und ihrer Affinität ab, sondern auch vom Ort, Zeitpunkt und der Stärke, mit der das entsprechende Antigen exprimiert wird. Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß CD4⁺ T-Zellen gegen ein lösliches Neoselbstantigen (VSV-G), das kontinuierlich in der Peripherie exprimiert wird, nicht reagieren. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß VSV-G über den Blutstrom auch in lymphoide Organe gelangt, war für die Toleranzentstehung eine Expression in diesen Organen nicht notwendig. Diese in der Peripherie induzierte T-Zelltoleranz war reversibel, da ein Transfer der anergen T-Zellen in eine antigenfreie Umgebung nach kurzer Zeit wieder ihre normale Reaktivität herstellte. Dies macht deutlich, daß Anergie eine "aktive Form" der Toleranz ist, die nicht mit der "passiven Form", der Ignoranz, verwechselt werden darf. Im Fall von immunologischer Ignoranz bleibt dem Immunsystem das Antigen wegen seiner ektopischen Expression verborgen. Eine Aktivierung solcher T-Zellen erfolgt deshalb erst nach Freisetzung von verborgenem Antigen durch eine Gewebeschädigung. (7, 54).

Wir konnten weiterhin zeigen, daß sich bei transgenen Tiere, die ein Neoselbstantigen entwicklungsabhängig exprimieren, Toleranz und Reaktivität im gleichen Tier mehrfach abwechseln können. Entscheidend dabei ist, in welcher Konzentration und an welchem Ort ein Selbstantigen exprimiert wird; Faktoren die nicht nur die Reaktivität der T-Zellen sondern auch die Art der Toleranzentstehung beeinflussen. Dass zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten sich nicht nur der Toleranzmechanismus von zentraler (klonale Deletion) nach peripherer Toleranz (Anergie) ändern kann, sondern auch Phasen normaler Immunreaktivität vorkommen, ist Ausdruck einer entwicklungsabhängigen Expression eines Selbstantigens. Damit demonstriert dieses Modell die Plastizität des Immunsystems, die benötigt wird um z.B. auf hormonell bedingte Veränderungen flexibel reagieren zu können, ohne dabei die Integrität des Organismus anzugreifen (55).

Wie bereits erwähnt wurde, hat eine antimikrobielle Immunantwort per se schon eine immunpathologische Komponente. Das Immunsystem muß eine genaue Balance finden zwischen der Notwendigkeit einen Erreger vollständig zu eliminieren und der Inkaufnahme dadurch entstehender Gewebeschädigungen. Diese Balance hängt selbstverständlich vom Erreger, seinem Potential Schaden zu verursachen und von der Infektionsdauer ab. Zieht man noch die Möglichkeit des molekularen Mimikrys in Betracht, d. h. eine gegen den Erreger gezielte Immunantwort richtet sich wegen der Ähnlichkeit der Antigene gleichzeitig auch gegen den eigenen Körper, kann aus einer physiologischen Autoimmunität plötzlich eine Autoimmunpathologie entstehen. Kreuzreaktive T-Zellen, die durch Erregerantigene aktiviert wurden, können selbst nach Beseitigung des Pathogens durch strukturähnliche Selbstantigene kontinuierlich weiterstimuliert werden. Als Folge davon kann es zu einer unkontrollierten Expansion und Aktivierung dieser T-Zellen kommen. Da Antigenähnlichkeiten zwischen Erreger

und Wirtsorganismus sehr häufig zu finden sind, durch Infektionen ausgelöste Autoimmunerkrankungen aber eher die Ausnahme sind, scheint unser Organismus gefährliche Autoimmunreaktionen in der Tat sehr effektiv kontrollieren zu können.

Im Tiermodell der durch Hsp60-reaktive CD8⁺ T-Zellen verursachten Entzündungsreaktion des Dünndarms konnten wir zeigen, daß der Ort der Immunpathologie nicht von der Expressionstärke des Selbstantigens abhängig ist. Unsere Untersuchungen demonstrierten, daß die Prozessierung von MHC-Klasse I Antigenen organspezifische Unterschiede aufweist, deren Ursache in der unterschiedlichen Zusammensetzung der 20S Proteasomen liegt. Biochemische Analysen zeigten, daß hiervon nicht nur die katalytisch aktiven β -Untereinheiten, sondern auch die regulatorischen α -Untereinheiten der Proteasomen betroffen sind. Daß diese organcharakteristischen, strukturellen Unterschiede einen großen Einfluß auf die Prozessierung von Peptiden, einschließlich der Generierung von T-Zellepitopen haben, konnte durch funktionelle Tests bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Immunpathologie im Tiermodell, waren nur die Proteasomen des Dünndarms in der Lage, das T-Zellepitope des murinen Hsp60 in solchen Mengen zu produzieren, die zu einer Aktivierung der Hsp60-spezifische T-Zellen führte.

Mit diesen Arbeiten konnten wir erstmalig zeigen, daß durch die organspezifische Prozessierung von MHC-Klasse I Antigenen der Körper über einen weiteren zentralen Mechanismus verfügt, um die Reaktivität von (auto)reaktiven CD8⁺ T-Zellen zu kontrollieren.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Eigenzitate

- (1) Steinhoff, U., C. Burkhardt, H. Hengartner and R. Zinkernagel (1993). Virus and hapten-carrier complexes can activate autoreactive B cells by providing linked T help. *Eur. J. Immunol.*, 24:773-776
- (2) Ulrich Steinhoff. Analysis of the antibody response against Vesicular Stomatitis Virus (VSV) and Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV). In: *Immunology Methods Manual*, Academic Press (1997)
- (3) Bachmann, M.F., U. Hoffmann Rohrer, U. Steinhoff, K. Bürki, S. Skuntz, H. Arnheiter, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (1994). T helper unresponsiveness: rapid induction in antigen transgenic and reversion in non-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 24:2966-2973
- (4) Steinhoff, U., K.J. Maloy, C. Burkhardt, A.J. Clark, T. Rüllicke, H. Hengartner and R.M. Zinkernagel (1999). Variable Immune response against a developmentally regulated self-antigen. *J. Autoimmun.* 12: 27-34
- (5) Kaufmann, S.H.E., B. Schoel, J.D.A. v. Embden, T. Koga, A. Wand-Württenberger, M.E. Munk and U. Steinhoff (1991). Heat-shock protein 60: implication for pathogenesis of and protection against bacterial infections. *Immunol. Reviews* 121:67-90
- (6) Steinhoff, U., U. Zügel, H.Hengel, R. Rösch, M.E. Munk and S.H.E. Kaufmann (1994). Prevention of autoimmune lysis by T cells with specificity for a heat shock protein by anti-sense oligonucleotide treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:5085-5088
- (7) Steinhoff, U., V. Brinkmann, U. Klemm, P. Aichele, P. Seiler, I. Prinz, U. Zügel and S.H.E. Kaufmann (1999). Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* 11: 349-358
- (8) Kuckelkorn, U. , T.Ruppert, P.Jungblut, U. Zimny-Arndt, S.Lamers, I.Prinz, I. Drung, P-M. Kloetzel, S.H.E. Kaufmann and U. Steinhoff (2002). A link between autoimmunity and organ-specific antigen processing by 20S proteasomes. *J.Exp. Med.* 195: 983-990

- (9) Prinz, I., J. Zerrhan, S.H.E. Kaufmann and U. Steinhoff. One of two expressed alpha chains of an autoreactive CD8+ T cell clone is functional and sufficient for crossreactivity.

7.2 Fremdizitate

1. Black, P. 2001. Why is the prevalence of allergy and autoimmunity increasing? *Trends Immunol.* 22:354-355.
2. Benoist, C. and D. Mathis. 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat. Immunol.* 2:797-801.
3. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273-280.
4. Bluthmann, H., P. Kieselow, Y. Uematsu, M. Malissen, P. Krimpenfort, A. Berns, H. von Boehmer, and M. Steinmetz. 1988. T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature* 334:156-159.
5. Zal, T., A. Volkmann, and B. Stockinger. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* 180:2089-2099.
6. Klein, L. and B. Kyewski. 2000. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.* 78:483-494.
7. Ohashi, P.S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C.T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305-317.
8. Webb, S., C. Morris, and J. Sprent. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 63:1249-1256.
9. Rocha, B. and H. von Boehmer. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 251:1225-1228.
10. Forster, I. 1998. Controlling autoreactivity of CD4 T cells by local tolerance induction. *Dev. Immunol.* 6:89-94.
11. Bevan, M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283-1288.
12. Miller, J.F., C. Kurts, J. Allison, H. Kosaka, F. Carbone, and W.R. Heath. 1998. Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self

antigens. *Immunol.Rev.* 165:267-277.

13. Miller, J.F. and W.R.Heath. 1993. Self-ignorance in the peripheral T-cell pool. *Immunol.Rev.* 133:131-150.
14. Oldstone, M.B., M.Nerenberg, P.Southern, J.Price, and H.Lewicki. 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65:319-331.
15. Bretscher, P.A. 1975. The two signal model for B cell induction. *Transplant.Rev.* 23:37-48.
16. Bretscher, P. 1992. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol.Today* 13:74-76.
17. Schwartz, R.H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J.Exp.Med.* 184:1-8.
18. Bell, D., J.W.Young, and J.Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv.Immunol.* 72:255-324.
19. Moskophidis, D., F.Lechner, H.Pircher, and R.M.Zinkernagel. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362:758-761.
20. Ehl, S., P.Aichele, H.Ramseier, W.Barchet, J.Hombach, H.Pircher, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1998. Antigen persistence and time of T-cell tolerization determine the efficacy of tolerization protocols for prevention of skin graft rejection. *Nat.Med.* 4:1015-1019.
21. Saoudi, A., B.Seddon, D.Fowell, and D.Mason. 1996. The thymus contains a high frequency of cells that prevent autoimmune diabetes on transfer into prediabetic recipients. *J.Exp.Med.* 184:2393-2398.
22. Fowell, D. and D.Mason. 1993. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J.Exp.Med.* 177:627-636.
23. Read, S., V.Malmstrom, and F.Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 192:295-302.
24. Martin, J. and F.U.Hartl. 1997. Chaperone-assisted protein folding. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 7:41-52.
25. Williams, D.B. and T.H.Watts. 1995. Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 7:77-84.
26. Kol, A., A.H.Lichtman, R.W.Finberg, P.Libby, and E.A.Kurt-Jones. 2000. Cutting

- edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J.Immunol.* 164:13-17.
27. Zugel,U. and S.H.Kaufmann. 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* 12:19-39.
 28. Cohen,I.R. 1991. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu.Rev.Immunol.* 9:567-589.
 29. Elias,D., D.Markovits, T.Reshef, Z.R.van der, and I.R.Cohen. 1990. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:1576-1580.
 30. van Eden,W., J.E.Thole, Z.R.van der, A.Noordzij, J.D.van Embden, E.J.Hensen, and I.R.Cohen. 1988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171-173.
 31. Elias,D. and I.R.Cohen. 1994. Peptide therapy for diabetes in NOD mice. *Lancet* 343:704-706.
 32. Yang,X.D., J.Gasser, and U.Feige. 1992. Prevention of adjuvant arthritis in rats by a nonapeptide from the 65-kD mycobacterial heat shock protein: specificity and mechanism. *Clin.Exp.Immunol.* 87:99-104.
 33. Yewdell,J.W. and J.R.Bennink. 1999. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 15:579-606.
 34. Craiu,A., T.Akopian, A.Goldberg, and K.L.Rock. 1997. Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10850-10855.
 35. Stoltze,L., M.Schirle, G.Schwarz, C.Schroter, M.W.Thompson, L.B.Hersh, H.Kalbacher, S.Stevanovic, H.G.Rammensee, and Schild H. 2001. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunology* 1:413-418.
 36. Groll,M., L.Ditzel, J.Lowe, D.Stock, M.Bochtler, H.D.Bartunik, and R.Huber. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature* 386:463-471.
 37. Morel,S., F.Levy, O.Burlet-Schiltz, F.Brasseur, M.Probst-Kepper, A.L.Peitrequin, B.Monsarrat, R.Van Velthoven, J.C.Cerottini, T.Boon, J.E.Gairin, and B.J.Van den Eynde. 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12:107-117.
 38. Burkhart,C., G.Freer, U.Steinhoff, Y.Li, D.H.Bishop, R.M.Zinkernagel, and H.Hengartner. 1994. Localization of T helper cell epitopes in the vesicular stomatitis virus: the nucleoprotein is responsible for serotype cross-reactive T

- help. *Viral Immunol* 7:103-111.
39. Young, R.A. 1990. Stress proteins and immunology. *Annu.Rev.Immunol.* 8:401-420.
 40. Nemazee, D.A. and K.Burki. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337:562-566.
 41. Adelstein, S., H.Pritchard-Briscoe, T.A.Anderson, J.Crosbie, G.Gammon, R.H.Loblay, A.Basten, and C.C.Goodnow. 1991. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science* 251:1223-1225.
 42. Zinkernagel, R.M. and H.Hengartner. 2001. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 293:251-253.
 43. McMurray, R.W. 2001. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int. Immunopharmacol.* 1:995-1008.
 44. Ito, A., B.F.Bebo, Jr., A.Matejuk, A.Zamora, M.Silverman, A.Fyfe-Johnson, and H.Offner. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J.Immunol.* 167:542-552.
 45. Kousta, E., N.J.Lawrence, V.Anyaoku, D.G.Johnston, and M.I.McCarthy. 2001. Prevalence and features of pancreatic islet cell autoimmunity in women with gestational diabetes from different ethnic groups. *BJOG.* 108:716-720.
 46. Muller, A.F., H.A.Drexhage, and A.Berghout. 2001. Postpartum thyroiditis and autoimmune thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. *Endocr.Rev.* 22:605-630.
 47. Akkaraju, S., W.Y.Ho, D.Leong, K.Canaan, M.M.Davis, and C.C.Goodnow. 1997. A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity.* 7:255-271.
 48. Powrie, F. 1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity.* 3:171-174.
 49. Rose, N.R. 1998. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin.Immunol.* 10:5-13.
 50. Kisielow, P. and H.von Boehmer. 1995. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv.Immunol.* 58:87-209.
 51. Takeda, S., H.R.Rodewald, H.Arakawa, H.Bluethmann, and T.Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T

cells, but affect their long-term life span. *Immunity*. 5:217-228.

52. Kirberg,J., H.von Boehmer, T.Brocker, H.R.Rodewald, and S.Takeda. 2001. Class II essential for CD4 survival. *Nat.Immunol.* 2:136-137.
53. Nestic,D. and S.Vukmanovic. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8+ thymic emigrants. *J.Immunol.* 160:3705-3712.
54. Zinkernagel,R.M., H.P.Pircher, P.Ohashi, S.Oehen, B.Odermatt, T.Mak, H.Arnheiter, K.Burki, and H.Hengartner. 1991. T and B cell tolerance and responses to viral antigens in transgenic mice: implications for the pathogenesis of autoimmune versus immunopathological disease. *Immunol.Rev.* 122:133-171.
55. Steinhoff,U., K.J.Maloy, C.Burkhart, A.J.Clark, T.Rulicke, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel. 1999. Variable immune response against a developmentally regulated self-antigen. *J Autoimmun* 12:27-34.

Eidstattliche Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Hilfsmittel selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Berlin, den 12.07.02..

Ulrich Steinhoff