

---

INSTITUT FÜR GENETIK  
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN

---

**Infiltrierende T-Lymphozyten bei Multipler Sklerose:  
Analyse von Rezeptorrepertoire und Antigenpezifitäten  
auf dem Niveau einzelner Zellen.**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Holger Babbe  
aus Augsburg

Köln, November 2001

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Rajewsky  
Prof. Dr. Jonathan Howard

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Februar 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Multiple Sklerose - Definition, Klinik und Risikofaktoren .....	1
1.2. Pathologie der MS.....	2
1.3. Grundzüge der Immunantwort.....	3
1.4. Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und die T-Zellreaktion.....	4
1.5. Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz .....	6
1.6. Verlust von Toleranz.....	7
1.7. Mögliche Szenarien der MS-Pathogenese .....	9
1.8. Die T-Zellreaktion in EAE und MS .....	10
1.9. Zielsetzung der Arbeit.....	11
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1. Patienten und Gewebe .....	13
2.2. Immunhistochemie und Zellzählungen .....	14
2.3. Mikromanipulation von Zellen aus Gefriergewebe .....	15
2.4. Amplifikation von TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus Einzelzellen auf chromosomaler DNA .....	16
2.5. Sequenzanalyse der PCR-Produkte .....	18
2.6. Sortierung von T-Zellen aus peripherem Blut.....	18
2.7. “CDR3 Spectratyping” der TCR $\beta$ -Transkripte von T-Zellen aus peripherem Blut.....	19
2.8. Klonierung von PCR-Produkten .....	20
2.9. Herstellung von Jurkat-Kontrollzellen für die klonspezifische PCR.....	20
2.10. Southern-Blot-Analyse .....	20
2.11. Klonspezifische PCR.....	21
2.12. In-vitro-Aktivierung, Expansion und Selektion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	23
2.13. Generierung von CD8 <sup>+</sup> T-Tellinien/-klonen durch Grenzverdünnung .....	24
2.14. 5'-RACE basierend auf dem “Template-Switching”-Effekt und der “Step-Out-PCR” .....	25

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
3.1.	Die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire des T-Zellinfiltrats von Hirnläsionen zweier MS-Fälle.....	27
3.1.1.	Auswahl des Hirnmaterials.....	27
3.1.2.	Mikromanipulation von einzelnen T-Zellen aus Gefrierschnitten von MS-Läsionen und Amplifikation ihrer TCR $\beta$ -Genumlagerungen.....	28
3.1.3.	Die Mehrheit der parenchymalen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in aktiven und inaktiven Läsionen beider MS-Fälle setzte sich aus wenigen Klonen zusammen .....	34
3.1.4.	Die klonale Zusammensetzung der parenchymalen CD4 <sup>+</sup> T-Zellpopulation war heterogener als die der CD8 <sup>+</sup> T-Zellpopulation.....	37
3.1.5.	Klonal expandierte T-Zellen waren im Parenchym im Vergleich zu den perivaskulären Bereichen häufiger .....	38
3.1.6.	Die TCR $\beta$ -V-Regionsequenzen einiger CD8 <sup>+</sup> T-Zellen zeigten Hinweise für Selektion für gemeinsame Peptidspezifitäten .....	38
3.2.	Die Detektion zweier im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter T-Zellklone im peripheren Blut des Patienten und der Versuch ihrer Isolierung .....	40
3.2.1.	In Fall 2 wurde ein im Hirnmaterial identifizierter CD8 <sup>+</sup> Klon mittels “CDR3-Spektratyping” auch im Blut des Patienten detektiert.....	40
3.2.2.	Ein zweiter im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter CD8 <sup>+</sup> Klon wurde mittels klonspezifischer PCR im Blut des Patienten detektiert.....	43
3.2.3.	Ein Nachweis der Klone 8 und 10 in (in vitro) expandierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen der Blutprobe “12 mo” von Fall 2 war nicht möglich...	46
3.3.	Etablierung und Anwendung einer 5`-RACE-Technik zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare für T-Zellklone der MS-Fälle 1 und 2.....	48
3.3.1.	Etablierung einer 5`-RACE-Methode auf dem Niveau einzelner Zellen sowie auf mikromanipuliertem Material zum Zweck der Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen.....	49
3.3.2.	Amplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kettensequenzen aus mikromanipulierten T-Zellen der MS-Fälle 1 und 2 mittels 5`-RACE zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare.....	55

<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
4.1. Die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire des T-Zellinfiltrats von Hirnläsionen zweier MS-Fälle .....	58
4.1.1. Auswahl des Materials .....	58
4.1.2. Verlässlichkeit der Einzelzell-PCR.....	59
4.1.3. Das T-Zellinfiltrat in aktiven MS-Läsionen.....	60
4.1.4. Mögliche funktionelle Eigenschaften der in den MS-Läsionen expandierten T-Zellklone .....	62
4.1.5. Die mögliche Bedeutung der Verteilungsmuster klonal expandierter T-Zellen in den Läsionen .....	66
4.1.6. Die Hinweise für die Selektion einiger CD8 <sup>+</sup> T-Zellen für gemeinsame Antigenpezifitäten .....	68
4.2. Die Detektion zweier im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter T-Zellklone im peripheren Blut des Patienten und der Versuch ihrer Isolierung.....	68
4.3. Etablierung und Anwendung einer 5'-RACE-Technik zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare für T-Zellklone der MS-Fälle 1 und 2.....	70
4.4. Weiterführende Experimente und Ausblick.....	71
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>73</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>85</b>
<b>7 SUMMARY</b> .....	<b>87</b>
<b>8 ANMERKUNGEN</b> .....	<b>89</b>

## ABKÜRZUNGEN

Bp	Basenpaare
CDR	Komplementaritäts-bestimmende Region des TCR
C-Region	konstante Region des TCR
D-Segment	“Diversitäts”-Gensegment der TCR $\beta$ -Kette
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GFAP	saures Gliafaserprotein
IL	Interleukin
IP	IFN-induzierbares Protein
J-Segment	“Verbindungs”-(Joining)-Gensegment der TCR $\alpha$ - und $\beta$ -Kette
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis Virus der Maus
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	basisches Myelinprotein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
ORO	“Oil Red O”
PBMCs	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phykoerythrin
PLP	Proteolipidprotein
RACE	Amplifikation von cDNA-Enden (“Rapid Amplification of cDNA Ends”)
RAG	“Recombination Activating Gene”
RT	reverse Transkription
TCR	T-Zellrezeptor
TMEV	Theiler`s Encephalomyelitis-Virus der Maus
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF	“Transforming-Growth-Factor”
V-Region	variable Region des TCR, bestehend aus V, (D) und J-Segmenten
V-Segment	“Variabilitäts”-Gensegment der TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kette
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1. Multiple Sklerose - Definition, Klinik und Risikofaktoren

Multiple Sklerose (MS) wird heute als eine durch das Immunsystem vermittelte Krankheit des Zentralnervensystems (ZNS) angesehen, die in genetisch prädisponierten Individuen unter Wechselwirkung mit bestimmten Umweltfaktoren vorkommt. Sie ist die häufigste entzündlich-demyelinisierende Krankheit des ZNS unter Nordeuropäern und Nordamerikanern. Trotz erheblicher Forschungsanstrengungen ist ihre Ätiologie weitgehend unbekannt, eine durch T-Zellen vermittelte autoimmun Pathogenese erscheint für einen Großteil der Betroffenen jedoch wahrscheinlich.

Etwa eine in 1000 in temperierten Regionen lebenden Personen nordeuropäischen Ursprungs erkranken im Laufe ihres Lebens an prototypischer MS. Die Krankheit betrifft alle Altersgruppen, erste klinische Symptome treten allerdings typischerweise im jungen Erwachsenenalter auf. Diese zeigen eine große Bandbreite, beispielsweise eine Beeinträchtigung des Sehvermögens (wie Gesichtsfeldausfälle, Doppelsichtigkeit), der sensorischen Wahrnehmung (wie Schmerz, Temperatur) und der Koordinationsfähigkeit, motorische Probleme (wie Benutzung der Hände, Gehvermögen) sowie Inkontinenz.

Bei den meisten Patienten (etwa 85%) beginnt MS als Krankheit mit schubhaftem Verlauf; auf einige Wochen mit neurologischen Funktionsstörungen folgen Phasen mit substanzieller oder gar kompletter Remission. Nachdem die Patienten mitunter über Jahre hinweg klinisch unauffällig geblieben sind, kommt es üblicherweise zu weiteren Schüben, von denen sie sich nicht mehr vollständig erholen, und es stellt sich bei einem Großteil eine graduelle, von einzelnen Schüben unabhängige klinische Verschlechterung ein (sekundär progressive MS). Bei einem kleinen Teil der Betroffenen (etwa 15%) verschlechtern sich die neurologischen Funktionen bereits von Beginn der Krankheit an graduell (primär progressive MS). Daneben existieren weniger häufige Varianten, wie die Balosche konzentrische Sklerose oder die akute MS des Marburg-Typs. Eine individuelle Prognose ist nicht möglich. Von MS mit schubhaftem Verlauf sind Frauen häufiger betroffen als Männer ( $\approx 1,6 : 1$ ). Es ist unklar, ob es sich bei der MS um eine einzige Entität handelt oder ob die verschiedenen klinischen Erscheinungsformen distinkte Krankheiten darstellen (s. Abschnitt 1.2.).

Eine Heilung ist nicht möglich. Für die schubhafte Form der MS existieren einige Möglichkeiten der Behandlung, die allerdings nur einen moderat positiven Einfluß auf den Krankheitsverlauf haben. So werden Kortikosteroide eingesetzt, um einen Schub beschleunigt zu beenden, während Agenzien wie  $\beta$ -Interferon oder Glatiramerazetat die Häufigkeit von klinisch auffälligen Schüben bei bestimmten Patienten verringern können (Martin und McFarland, 1995; Noseworthy, 1999; Steinman, 1996b).

Die MS-Suszeptibilität wird durch genetische Faktoren beeinflusst. Die Konkordanzrate unter eineiigen Zwillingen (d.h. beide Individuen sind betroffen) beträgt etwa 30% und liegt damit 6-10fach höher als die unter zweieiigen Zwillingen oder Geschwistern. Dieses Risiko wiederum bedeutet im Vergleich zu dem der Normalbevölkerung noch immer eine 20-40fache Erhöhung. Es herrscht heute Übereinkunft, daß bestimmte Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) oder eng benachbarte Gene mit MS assoziiert sind. Beispielsweise ist der Haplotyp HLA-DR2 für Nordeuropäer kaukasischen Ursprungs mit einem 4fachen relativen MS-Risiko behaftet. Allerdings trägt eine Vielzahl der Betroffenen diesen oder andere assoziierte Haplotypen nicht, so daß diese für ein Ausbrechen der Krankheit weder notwendig noch hinreichend sind. Für weitere Loci mit bedeutendem Beitrag zur Gesamtsuszeptibilität sind bis heute keine überzeugenden Hinweise gefunden worden. Somit ist von einer oligogenen Vererbung der Suszeptibilität auszugehen (Dyment et al., 1997; Noseworthy, 1999; Steinman, 1996b).

Weiterhin existiert ein bedeutender Einfluß von Umweltfaktoren. Für diesen gelten Migrationsstudien genauso als Indizien wie die Beobachtungen, daß bei 70% der Paare von eineiigen Zwillingen nicht beide Individuen an MS erkranken oder, daß die Krankheit in den temperierten Klimaten der Erde in weißen Populationen am häufigsten vorkommt. Es gibt eine Reihe von indirekten Hinweisen darauf, daß bestimmte infektiöse Agenzien für das Auslösen der Krankheit verantwortlich sein könnten, so z.B. Nachweise von Virengenomen in ZNS-Gewebe, virale MS-Tiermodelle und die Beobachtung, daß bis zu 25% der Schübe mit viralen Infektionen einhergehen. Beispielsweise wurde in den letzten Jahren der Frage einer möglichen Rolle des humanen Herpesvirus Typ 6 (HHV-6) in der MS-Ätiologie intensiv nachgegangen. Während HHV-6-kodierte Proteine in MS-Läsionen nachgewiesen werden konnten, blieben Versuche, Zeichen der Reaktivierung dieses Virus in MS-Patienten mittels Serologie und Polymerasekettenreaktion (PCR) zu detektieren, uneindeutig. Letztlich ist es bis heute nicht gelungen, die (Re-) Aktivierung dieses Virus mit Phasen der Krankheitsaktivität in einen kausalen Zusammenhang zu bringen. Generell ist ein Einfluß infektiöser Agenzien auf die MS-Pathogenese durchaus vorstellbar, jedoch ist er ebenso wenig geklärt wie die Natur möglicher Umweltfaktoren überhaupt (Kurtzke, 1983; Meinl, 1999; Monteyne et al., 1998; Noseworthy, 1999).

## 1.2. Pathologie der MS

Das besondere Kennzeichen der MS ist ein klar definierter demyelinisierter Bereich in der weißen Substanz des ZNS, die MS-Läsion (oder -Plaque). In normal myelinisierten Regionen sind die Axone der Nervenfasern mit speziellen Lagen von Zellmembran, den Myelinscheiden, umwickelt. Die Membran stammt von einem spezialisierten Zelltyp, dem Oligodendrozyten. Entlang den Nervenfasern sind die Myelinscheiden in bestimmten Abständen von den sogenannten Ranvierschen Schnürringen unterbrochen,

welche für eine rasche Weiterleitung der Nervenimpulse essentiell sind. Spannungsabhängige Natriumkanäle sind in diesen Bereichen konzentriert, und Aktionspotentiale springen via "saltatorischer Reizweiterleitung" von Schnürring zu Schnürring. Nach Zerstörung der Myelinscheiden kann die "saltatorische Reizweiterleitung" nicht mehr stattfinden, so daß die Weiterleitung der Nervenimpulse gestört ist oder gar völlig zum Erliegen kommt, was die genannten klinischen Symptome der Krankheit zur Folge hat.

Demyelinisierte Läsionen können prinzipiell an jeder Stelle im ZNS auftreten, allerdings sind vorzugsweise der optische Nerv, der Hirnstamm, das Rückenmark und periventriculäre Regionen betroffen. Akute Läsionen sind im allgemeinen durch ein entzündliches Zellinfiltrat gekennzeichnet, das hauptsächlich aus T-Lymphozyten und Makrophagen besteht und in Form von perivaskulären Aggregaten um postkapilläre Venolen herum lokalisiert ist. Die T-Zellen und Makrophagen kommen zudem einzeln über das Parenchym verstreut vor. Weiterhin kommt es außer zu Myelinabbau zu einem Verlust an Oligodendrozyten, zur Aktivierung und Proliferation von Astrozyten sowie, in gewissem Ausmaß, zur Durchtrennung von Axonen. Während akut entzündlicher Phasen ist die Blut-Hirn-Schranke geschädigt, weshalb Serumproteine im Parenchym der Läsionen nachweisbar sind. Chronisch inaktive Läsionen zeigen wenig entzündliche Aktivität, kaum Oligodendrozyten und weitgehend demyelinisierte Axone, die von einem dichten Netzwerk von Axonprozessen umwoben sind (Narbenbildung). Es kommt zu Heilungsprozessen (Remyelinisierung), die jedoch zumeist unvollständig verlaufen und auf frühe Krankheitsphasen beschränkt sind.

T-Lymphozyten stehen im Verdacht, eine möglicherweise zentrale Rolle in der MS-Pathogenese zu spielen. Dies ergibt sich nicht nur aus ihrer zumeist massiven Präsenz in MS-Läsionen und der Assoziation bestimmter MHC-Allele mit einem erhöhten Krankheitsrisiko - für die Antigenerkennung durch die meisten T-Zellen sind MHC-Moleküle essentiell (s.u.) -, sondern auch aus verschiedenen T-Zell-vermittelten Tiermodellen für entzündliche Demyelinisierung. Daß diese T-Zellen - bzw. ein Teil von ihnen - in einer Vielzahl der Patienten autoreaktiv sind, d.h. eine spezifische Immunantwort gegen im ZNS ausgeprägte, körpereigene Antigene vermitteln, erscheint wahrscheinlich, ist jedoch nicht bewiesen (Brosnan und Raine, 1996; French-Constant, 1994; Martin und McFarland, 1995; Wekerle, 1998).

### **1.3. Grundzüge der Immunantwort**

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist in der Lage, in den Körper eingedrungene Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren. Neben dem Teil des Immunsystems, der die angeborene Immunität vermittelt und durch phagozytierende Zellen sowie das Prinzip der Erkennung körperfremder Substanzklassen getragen wird, existiert ein anderer Teil, der die hochspezifische adaptive Immunität vermittelt. Zwei Typen von Lymphozyten ermöglichen eine spezifische Erkennung von körperfremden Antigenen.

B-Zellen sind in der Lage, zellulär gebundene oder lösliche Proteinantigene zu binden, was durch Immunglobuline - in Form des membrangebundenen B-Zellrezeptors oder der löslichen Antikörper - vermittelt wird. T-Zellen hingegen erkennen durch ihren  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TCR) Peptidantigene, die ihnen durch "Antigen präsentierende Zellen" - eingebettet in die Peptid-bindende Spalte von MHC-Molekülen - präsentiert werden müssen ("MHC-Restriktion" der Antigenerkennung durch T-Zellen). Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen. Die der Klasse I sind auf den meisten Körperzellen vorhanden und binden zumeist Peptide, die aus im Zytosol abgebauten Proteinen stammen (z.B. virale Proteine). Die Erkennung dieser MHC:Peptidkomplexe erfolgt durch T-Zellen, die den CD8-Korezeptor tragen.  $CD8^+$  T-Zellen wirken zytotoxisch und töten die infizierte, das Antigen präsentierende Zelle ab. MHC-Moleküle der Klasse II werden hingegen fast ausschließlich von sogenannten "professionellen Antigen präsentierenden Zellen", d.h. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, ausgeprägt. Sie binden Peptide von Proteinen, die in endosomalen Vesikeln abgebaut werden und ursprünglich aus dem Extrazellulärraum stammen. Erkannt werden sie von  $CD4^+$  T-Zellen, welche in erster Linie als Helferzellen fungieren, d.h. B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen anregen, Makrophagen dazu befähigen, intrazelluläre Pathogene abzutöten oder Hilfe bei der Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen leisten. Außerdem können sie pro- oder anti-inflammatorische Cytokine produzieren oder durch Ausprägen des Fas-Liganden über den Fas:Fas-Ligand-Signalweg zytotoxisch wirken.

#### 1.4. Die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und die T-Zellreaktion

Die Entwicklung von (im Knochenmark gebildeten) T-Zell-Vorläuferzellen zu reifen T-Lymphozyten findet im Thymus statt und ist mit der Umordnung der Gensegmente für den TCR und Selektion der reifenden T-Zellen verbunden. Der heterodimere, membranständige TCR der weitaus meisten T-Zellen besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette besteht aus einem variablen und einem konstanten Bereich (V- bzw. C-Region), die mittels Spleißen des mRNA-Moleküls zusammengelagert werden. Die große Diversität des TCR - geschätzte potentielle Diversität  $10^{15}$ - $10^{20}$  (Davis und Bjorkman, 1988; Lieber, 1991) - ergibt sich aus der Struktur der V-Region. Sie setzt sich aus je einem V- und J-Segment ( $\alpha$ -Kette) bzw. je einem V-, D- und J-Segment ( $\beta$ -Kette) zusammen, die durch Genumlagerung (somatische Rekombination) der chromosomalen DNA aneinandergelagert werden. Auf diese Weise werden aus Exonfragmenten, die auf dem Chromosom voneinander getrennt liegen, funktionelle Exons erzeugt. Für die Bildung von V-Regionen stehen im Menschen 42 funktionelle TCRAV- (EMBL/GenBank/DDBJ AE000658-AE000662) und 61 TCRAJ- (EMBL/GenBank/DDBJ M94081) bzw. 46 TCRBV-, 2 TCRBD- und 13 TCRBJ-Segmente (Rowen et al., 1996) zur Verfügung. Ein Teil der Diversität kommt durch die im wesentlichen willkürliche

Kombination von V- (D-) und J-Segmenten sowie der beiden TCR-Ketten zustande. Weitere Diversität entsteht durch den hypervariablen Charakter der sogenannten "komplementaritätsbestimmenden Region" (CDR)-3. Bei dieser handelt es sich um die Verbindungsstellen der Gensegmente, also den V-(D)-J-Übergang der V-Region, bei denen es sowohl zum Verlust einzelner Nukleotide als auch zum Einbau von nicht Keimbahn-kodierten Nukleotiden (N-Nukleotide) an den Segmentenden kommt.

Es ist äußerst unwahrscheinlich, daß im Körper T-Zellen entstehen, deren Rezeptorketten infolge zweier unabhängiger Umlagerungsereignisse entstanden sind, aber trotzdem die exakt gleichen CDR3-Sequenzen aufweisen. Die CDR3 ist somit für jede TCR $\alpha$ - oder TCR $\beta$ -Kette charakteristisch, und deren Analyse daher in besonderem Maße dazu geeignet, T-Zellen auf ihre klonale Verwandtschaft hin zu untersuchen.

Im Zuge der beschriebenen Rekombinationsereignisse entsteht ein Pool von T-Zellen, welche die Gensegmente für beide Ketten zumindest je einmal produktiv umlagern konnten, das "unselektierte T-Zellrepertoire". Die Rekombinationsereignisse erzeugen bisweilen auch unproduktive Umlagerungen, nämlich dann, wenn ein Stop-Codon in die CDR3-Region eingebaut, das korrekte Leseraster in diesem Bereich verlassen oder ein Pseudogen umgelagert wird. Da prinzipiell beide Allele rekombinieren können, findet sich bei Analyse einer T-Zelle neben der produktiven mitunter auch eine das zweite Allel betreffende, nicht-produktive Umlagerung.

Es folgen die positive und negative Selektion, deren Sinn es ist, nur solche T-Zellen in die Peripherie zu entlassen, die auf körperfremde Antigene reagieren, körpereigene ("Selbst-") Antigene jedoch tolerieren. Die Konsequenzen der Bindung eines bestimmten TCR an einen MHC:Peptid-Komplex werden durch die Affinität der Interaktion und den Reifestatus der T-Zelle bestimmt. Das positiv-selektierende Signal erhält die unreife T-Zelle durch eine niedrig-affine Interaktion ihres Rezeptors mit einem MHC-Molekül, das mit einem beliebigen Selbst-Peptid beladen ist. Kommt es hier jedoch zu einer hoch-affinen Interaktion, so wird diese Zelle durch negative Selektion (durch programmierten Zelltod) eliminiert, da sie potentiell autoreaktiv ist (Induktion von "zentraler Toleranz" durch "klonale Deletion"). Durch eine niedrig-affine Interaktion mit MHC-Molekülen entweder der Klasse I oder II wird zugleich festgelegt, ob die T-Zelle dem CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellpool zufällt. Die reifen, selektierten T-Zellen gelangen in die sekundären lymphatischen Organe der Peripherie, wo sie das Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen erwarten.

Bei einer T-Zell-Immunantwort gegen ein beispielsweise virales Fremdantigen wird die naive, für dieses Antigen spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zelle durch eine hochaffine Interaktion mit (Virus-) Peptid:MHC-Komplexen aktiviert und proliferiert bis zu 16 mal, so daß sie, ausgehend von einer Frequenz von etwa einer in 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Goldrath und Bevan, 1999; Zinkernagel, 1996), nach acht Tagen den größten Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation ausmachen kann. Die Aktivierung muß dabei durch eine professionelle Antigen präsentierende Zelle erfolgen, die nicht nur das Antigen präsentie-

ren, sondern auch ein sogenanntes "kostimulatorisches Signal" liefern kann. Diese große Zahl an Effektorzellen tötet nach Antigenkontakt infizierte Körperzellen ab bzw. produziert Zytokine. Wenige Tage nach Eliminierung des Antigens sterben 90-99% der Effektorzellen ab und zurück bleibt eine expandierte, langlebige Population von Virus-spezifischen Gedächtniszellen. Diese sind bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger in der Lage, schnell zu expandieren und ihre Effektoraufgaben zu erfüllen. Die Aktivierung der Gedächtniszellen kann nun auch durch Ligation des TCR ohne Kostimulation stattfinden (Goldrath und Bevan, 1999).

### **1.5. Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz**

Das adaptive Immunsystem eines Erwachsenen muß über die Fähigkeit verfügen, auf eine enorme Vielfalt von infektiösen Agenzien reagieren zu können, es muß jedoch gleichzeitig Immunantworten gegen in Körpergeweben ausgeprägte Selbst-Antigene (d.h. Autoimmunität) verhindern. Ein Großteil der potentiell autoreaktiven T-Zellen wird bereits im unreifen Stadium durch klonale Deletion im Thymus, d.h. durch Induktion von zentraler Toleranz (s. Abschnitt 1.4.), eliminiert. Jedoch gelangen nicht alle Autoantigene zum Thymus oder werden dort ausgeprägt, so daß nicht sämtliche potentiell autoreaktive T-Zellen dort absterben. Weiterhin ist heute klar, daß das reife Immunsystem T-Zellen enthält, die sogar Autoantigene erkennen, welche im Thymus ausgeprägt werden, so auch einige encephalitogene Antigene des ZNS wie das basische Myelinprotein (MBP) oder das Astrozytenprotein S100 $\beta$  (Liu et al., 1995; Wekerle et al., 1996; Zal et al., 1996). Diese Zellen werden durch periphere, zumeist aktive Mechanismen der Toleranzinduktion kontrolliert.

Es kommt zu "klonaler Ignoranz", wenn das Antigen vor der naiven, potentiell autoreaktiven T-Zelle, die im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen zirkuliert, verborgen bleibt, beispielsweise hinter der für naive (im Gegensatz zu aktivierten) T-Zellen undurchlässigen Blut-Hirn-Schranke (Hickey et al., 1991; Wekerle et al., 1986). Klonale Ignoranz kann jedoch auch dann gegeben sein, wenn die naive T-Zelle durch auf bestimmten Körperzellen vorhandenes Selbst-Antigen schlicht so gut wie gar nicht stimuliert wird, beispielsweise, wenn diese Körperzellen kaum MHC Klasse I-Moleküle oder keine MHC Klasse II- und kostimulatorische Moleküle ausprägen. Erfolgt jedoch adäquate Antigenpräsentation und Kostimulation, so sind diese ignoranten T-Zellen sehr wohl aktivierbar (Ohashi et al., 1991; Oldstone et al., 1991).

"Klonale Inaktivierung" (Anergie) erfolgt, wenn einer naiven T-Zelle ihr Antigen in der Peripherie von einer nicht professionellen Antigen präsentierenden Zelle, d.h. ohne Kostimulation, präsentiert wird (Müller et al., 1989; Schwartz, 1990).

Weiterhin ist heute klar, daß Populationen von suppressiv wirkenden T-Zellen im Körper existieren, die Autoimmunität zu verhindern im Stande sind. Diese regulatorischen T-Zellen scheinen nach wiederholtem Antigenkontakt anergisch geworden zu sein und die Fähigkeit erworben zu haben, Immunantworten herunterzuregulieren. Sie

wirken Antigen-spezifisch und sind u.a. gekennzeichnet durch Sekretion suppressiv wirkender Zytokine, wie Interleukin (IL)-10 und “transforming-growth-factor” (TGF)- $\beta$  (Anderton et al., 1999; Mason und Powrie, 1998b). Daneben werden weitere Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion diskutiert, wie das Auslösen des programmierten Zelltods infiltrierender T-Zellen an immunologisch privilegierten Orten oder die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie (Anderton et al., 1999).

### **1.6. Verlust von Toleranz**

Sind die Mechanismen zur Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz unwirksam, kann es zu Autoimmunität kommen. Das jeweils auslösende Ereignis ist in den meisten Fällen nicht bekannt, jedoch erscheinen bestimmte Infektionen in genetisch prädisponierten Individuen - auch bei anderen Autoimmunkrankheiten als der MS (Marrack et al., 2001) - als plausible Möglichkeit (Evans et al., 1996; Fujinami und Oldstone, 1985; Goverman et al., 1993). Tiermodelle der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) und der durch das Theiler's Encephalomyelitis-Virus (TMEV) induzierten Encephalomyelitis der Maus (s.u.) wurden zur Klärung dieser Frage eingesetzt. EAE gilt als das wichtigste Tiermodell der MS, da die verschiedenen Varianten der EAE der MS in bestimmten Aspekten ähneln. EAE ist eine akute oder chronisch schubhaft verlaufende entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS, die durch encephalitogene T-Zellen verursacht wird und in suszeptiblen Tierstämmen durch Injektion von Myelinbestandteilen (plus Adjuvant) oder durch Transfer encephalitogener T-Zellen ausgelöst werden kann (Ben-Nun et al., 1981; Paterson, 1960; Rivers und Schwentker, 1935; Stone, 1961; t'Hart et al., 2000). Werden Mäuse, die für einen MBP-spezifischen TCR transgen sind, in Pathogen-freier Umgebung gehalten, so erkranken sie nur selten an EAE. Leben sie jedoch in konventionellen Tierställen und sind somit Pathogenen ausgesetzt, so entwickeln sie diese Krankheit häufig spontan (Goverman et al., 1993).

Als Mechanismen für den Verlust von Toleranz wird eine Reihe von sich z.T. überschneidenden, hier zumeist anhand von MS-relevanten Beispielen erläuterten Konzepten diskutiert. Ihre Bedeutung für die MS ist bislang allerdings nicht geklärt.

So muß der primäre Gewebsschaden nicht die Folge einer Autoantigen-spezifischen Immunreaktion sein (Miller et al., 1995; Miller et al., 1997; Wisniewski und Bloom, 1975). Zur Untersuchung dieses Phänomens in demyelinisierenden Krankheiten war die TMEV-induzierte Encephalomyelitis der Maus maßgeblich. Eine intracerebrale Infektion mit diesem Picornavirus führt bei suszeptiblen Mausstämmen zu einer immunvermittelten, entzündlich demyelinisierenden Erkrankung des ZNS, die chronisch verläuft (Lipton und Dal Canto, 1976; Miller et al., 1995). Durch ein bestimmtes Ereignis, wie eben eine Virusinfektion von Zellen des ZNS in Verbindung mit einer gegen

das Virus gerichteten Immunreaktion, kann eine Gewebsschädigung und die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke ausgelöst werden. Daraufhin werden zuvor sequestrierte, potentiell autoantigene Proteine freigesetzt, in die Peripherie entlassen und den naiven Lymphozyten erstmalig zugänglich gemacht. Dies könnte zur Aktivierung autoreaktiver, von der zentralen Toleranzinduktion nicht betroffener T-Zellen führen (Miller et al., 1995; Miller et al., 1997). Eine unvollkommene Induktion von zentraler Toleranz ist insbesondere für T-Zellen mit Peptidspezifitäten gegen Proteine vorstellbar, die im ZNS im Vergleich zum Thymus in einer anderen Isoform synthetisiert werden. So wird das Myelin-Protein Proteolipid-Protein (PLP) im Thymus der Maus in einer verkürzten Isoform ausgeprägt, was dazu führt, daß zwar für die Epitope dieser Isoform zentrale Toleranz induziert wird, für die zusätzlichen der im ZNS ausgeprägten Isoform jedoch nicht (Anderson et al., 2000; Klein et al., 2000).

Ein Phänomen, das hier zum tragen kommen kann, ist als "Determinant Spreading" bekannt. Beim "Determinant Spreading" entsteht im Laufe einer Immunantwort eine Reaktivität gegen andere (virale oder körpereigene) Antigene als die, welche für die Initiation der Autoimmunkrankheit maßgeblich waren. Die zusätzlich in die Immunantwort einbezogenen Antigene können entweder von demselben oder einem anderen Molekül stammen. Somit kann dieses Phänomen sowohl zu einer Diversifizierung als auch zu einer Veränderung der Zielrichtung der Immunreaktion (antiviral -> autoreaktiv) führen (Lehmann et al., 1992; Lehmann et al., 1993; Miller et al., 1997; Tuohy et al., 1999).

Darauf z.T. aufbauend besagt die Hypothese der "kryptischen-Selbst-Antigene", daß jedes Selbst-Protein nur eine geringe Zahl an dominanten Epitopen besitzt, welche im Körper in hohem Maße präsentiert werden und in der negativen Selektion potentiell autoreaktiver T-Zellen im Thymus involviert sind. Für die große Zahl an subdominanten (kryptischen) Epitopen wird hingegen keine Toleranz induziert. Pathogene, wie etwa Viren, könnten den initialen Stimulus zur Aktivierung von T-Zellen mit solchen Spezifitäten liefern, entweder, indem sie die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen auf Antigen präsentierenden Zellen in höherer Dichte induzieren, was eine verstärkte Präsentation dieser kryptischen Epitope ermöglicht, oder durch "molekulares Mimikry" (Lehmann et al., 1993; Theofilopoulos, 1995).

Das Konzept des "molekularen Mimikry" impliziert eine strukturelle Homologie zwischen einem Protein eines Pathogens und einem Selbst-Protein. So würden T-Zellen, die im Zuge einer gegen dieses Pathogen gerichteten Immunantwort aktiviert worden sind, mit Selbst-Antigenen kreuzreagieren (Steinman, 1996b; Theofilopoulos, 1995). Beispielsweise finden sich Homologien zwischen der Aminosäuresequenz von MBP und bestimmten aus Pathogenen stammenden Proteinen, wie Pseudomonaden oder dem Masern-, Hepatitis B- oder Influenzavirus (Wucherpfennig und Strominger, 1995). Es konnte auch gezeigt werden, daß EAE in Kaninchen durch Immunisierung mit einem Peptid, das aus dem Hepatitis B-Virus stammt und Homologie zu MBP aufweist, ausgelöst werden kann (Fujinami und Oldstone, 1985). Da das hohe Maß an Kreuzreaktivität auf dem Niveau der einzelnen Zelle in den letzten Jahren zunehmend

offenbar wurde (Mason, 1998a), erscheint dieses Konzept auch für den Fall begrenzter Sequenzhomologien plausibel. Inwieweit es bei Autoimmunkrankheiten jedoch tatsächlich eine Rolle spielt, bleibt nach wie vor umstritten (Benoist und Mathis, 2001).

Schließlich und in Abgrenzung zu molekularem Mimikry könnten Pathogene die Selbst-Toleranz zerstören, ohne daß die Antigenpezifität eine Rolle spielte. Dieses Konzept hat mehrere Varianten, die unter dem Begriff "bystander activation" zusammengefaßt sind. Die Pathogene könnten die Toleranz zerstören, indem sie, wie weiter oben bereits genannt, Gewebsschäden und damit die Freisetzung von Selbst-Antigenen auslösen, die Effektivität der Präsentation dieser Antigene erhöhen bzw. die Präsentation erst ermöglichen oder das regulatorische Gleichgewicht zur Kontrolle potentiell autoreaktiver Zellen stören (Benoist und Mathis, 1998; Horwitz et al., 1998; Wekerle, 1998).

### **1.7. Mögliche Szenarien der MS-Pathogenese**

Die Pathogenese der MS ist nach wie vor ungeklärt. Jedoch existieren plausible Szenarien, die aufgrund der Histopathologie der MS-Läsionen, der Ergebnisse aus in-vitro-Versuchen und insbesondere aus Tiermodellen entwickelt wurden. Die wichtigsten (bislang jedoch alle unbewiesenen) Konzepte werden im folgenden erläutert.

Im peripheren Blut suszeptibler Individuen vorhandene  $CD4^+$  T-Lymphozyten mit Spezifitäten für Myelinantigene werden durch Mikroben durch einen der oben diskutierten Mechanismen aktiviert und gelangen über eine intakte oder bereits geschädigte Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Dort treffen sie auf ihr Antigen, das ihnen vornehmlich von miteingewanderten Makrophagen oder Mikroglia, der Makrophagenpopulation des ZNS, MHC Klasse II restringiert präsentiert wird. Diese T-Zellen sowie die Antigen präsentierenden Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine, was zur Aktivierung von Endothel- und Gliazellen (Mikroglia und Astrozyten) führt und mit einer Hochregulation der MHC-Expression auf diesen Zellen verbunden ist. Zudem werden weitere Lymphozyten und Monozyten an den Entzündungsherd gelockt. Diese neu rekrutierten Zellen werden dort durch Zytokine wie IL-2,  $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$  aktiviert und zur Sekretion toxisch wirkender Mediatoren angeregt, wodurch zunächst die Myelinscheiden zerstört werden und später Oligodendrozyten sowie Axone zugrunde gehen. Gewebserstörend wirken u.a.  $TNF\alpha$ , proteolytische und lipolytische Enzyme sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Intermediate von Makrophagen, Myelin-reaktive intrathekal synthetisierte Antikörper, Komponenten der aktivierten Komplementkaskade sowie Antikörper- und Komplement-vermittelte Phagozytose von Myelin durch Makrophagen. Die Effektorfunktionen von  $CD4^+$  T-Lymphozyten sind vornehmlich die Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung von Makrophagen. Als mögliche Ziele einer spezifischen Immunantwort kommen u.a. das MBP, das PLP, das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) oder das induzier-

bare Hitzeschockprotein Crystallin- $\alpha$ B in Frage. Eine Erweiterung der Immunreaktivität von zunächst einem oder wenigen zu einer Vielzahl von Epitopen desselben oder eines anderen Proteinmoleküls (intra- bzw. intermolekulares "Determinant Spreading") erscheint dabei wahrscheinlich (Brosnan und Raine, 1996; Hafler und Weiner, 1995; Hohlfeld, 1997; Martin und McFarland, 1995; Steinman, 1996b).

Dieses Grundschema erfuhr in den letzten Jahren einige Verfeinerungen. Nachdem die Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen über Jahrzehnte fast ausschließlich den Mittelpunkt der T-Zell-relevanten Forschung bildete, wird seit kurzer Zeit auch der Subpopulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine erhöhte Aufmerksamkeit zuteil. So wird dieser nun ebenso eine möglicherweise wichtige Rolle in den autoimmunen Demyelinisierungsprozessen bei der MS zugebilligt (Noseworthy, 1999; Steinman, 2001).

In letzter Zeit rückt zudem die seit langem bekannte Heterogenität sowohl der Krankheit als auch der vorhandenen Tiermodelle zunehmend in den Mittelpunkt, woraus eine komplexe Pathogenese abgeleitet wird, der die oben erläuterte simple Abfolge der genannten Pathogenesemechanismen allein nicht gerecht wird (Lassmann et al., 1998; Lucchinetti et al., 2001). Unter Verwendung verfeinerter neuropathologischer Methoden wurden anhand von aktiv demyelinisierenden Läsionen einer Vielzahl von MS-Fällen verschiedene Muster des Myelinabbaus definiert. Es fanden sich keine unterschiedlichen Muster beim Vergleich verschiedener Läsionen desselben Patienten, sehr wohl aber beim Vergleich von Läsionen mehrerer Individuen. Es wurden insgesamt vier Muster der Demyelinisierung unterschieden. Der größte Teil der Fälle ähnelte T-Zell- oder T-Zell- plus Antikörper-vermittelten autoimmunen EAE-Modellen, bei einem kleineren lag eine primäre (Virus- oder Toxin-induzierte) nicht-autoimmune Oligodendrozytendystrophie nahe. Es erscheint also möglich, daß unterschiedliche Pathogenesemechanismen in verschiedenen Gruppen von MS-Patienten zum tragen kommen (Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti et al., 1996).

## **1.8. Die T-Zellreaktion in EAE und MS**

Für die Mehrzahl der beschriebenen Formen von MS wird angenommen, daß autoreaktive T-Zellen an der initialen Gewebsschädigung beteiligt sind. Es ist gesichert, daß CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Myelinspezifitäten Teil des normalen T-Zellrepertoires sind (Martin und McFarland, 1995). Die Ergebnisse aus zahlreichen Studien hinsichtlich der Häufigkeit solcher T-Zellen im Blut erkrankter im Vergleich zu gesunden Individuen sind widersprüchlich (Chou et al., 1992; Martin und McFarland, 1995; Olsson et al., 1992; Ota et al., 1990; Zhang et al., 1992a). Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß die Häufigkeit von in vivo aktivierten T-Zellen mit Myelinspezifitäten in MS-Patienten höher ist (Allegretta et al., 1990; Bieganowska et al., 1997; Zhang et al., 1994). Oligoklonal expandierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten detektiert (Hafler et al., 1988; Lee et al., 1991). Außerdem wurde eine erhöhte Frequenz von oligoklonalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche bestimmte TCRBV-Gensegmente ausprägen,

im Blut von MS-Patienten im Vergleich mit normalen Individuen gefunden (Monteiro et al., 1996).

Was das T-Zellrepertoire in erkranktem ZNS-Gewebe betrifft, so wurde in der durch PLP- oder MBP-Peptide induzierten EAE der Maus gezeigt, daß polyklonale  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  T-Zellen in den entzündlichen Infiltraten dominieren (Bell et al., 1993; Kuchroo et al., 1992; Sobel und Kuchroo, 1992). Bei Experimenten in der Ratte zeigte sich das folgende Bild. Nach Auslösen von EAE durch Transfer einer T-Zelllinie mit MBP-Spezifität bzw. durch Immunisierung mit MBP zeigten sich polyklonale T-Zellen in den perivaskulären Infiltraten, dagegen handelte es sich bei einem großen Teil der ins Parenchym eingewanderten T-Zellen um Vertreter der (injizierten bzw. induzierten) encephalitogenen T-Zellpopulation (Lannes-Vieira et al., 1994; Tsuchida et al., 1993).

Was die Natur von T-Zellen in MS-Läsionen angeht, so sind nur begrenzt Informationen vorhanden; die von den T-Zellen erkannten Antigene sind völlig unbekannt. Das T-Zellinfiltrat ist hauptsächlich aus  $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+$  und  $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ , bisweilen auch  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  T-Zellen in unterschiedlichen Proportionen zusammengesetzt (Brosnan und Raine, 1996; Sobel, 1989; Traugott et al., 1983a). Einige frühere Studien haben das in MS-Läsionen ausgeprägte  $\text{TCR}\alpha\beta$  Repertoire untersucht. Eine Gruppe (Wucherpfennig et al., 1992) beschrieb die Anwesenheit von polyklonalen T-Zellopopulationen im Infiltrat, indem sie von mRNA, die aus ganzen Gewebeblöcken extrahiert worden war, mittels reverser Transkription und anschließender PCR (RT-PCR) TCR-Genumlagerungen amplifizierte. Unter Verwendung ähnlicher Ansätze fanden andere Studien Hinweise für eine gewisse Restriktion des von infiltrierenden T-Zellen ausgeprägten TCR-Repertoires (Birnbaum und van Ness, 1992; Oksenberg et al., 1993; Oksenberg et al., 1990). Jedoch waren aufgrund der gewählten Methoden weder Aussagen hinsichtlich der Größe eventuell vorhandener expandierter T-Zellklone möglich, noch konnten die Sequenzdaten der  $\text{CD4}^+$  oder der  $\text{CD8}^+$  Subpopulation zugeordnet werden. Eine Klassifizierung der untersuchten Läsionen als "aktiv demyelinisierend" fand zudem überhaupt nicht oder nur in unzureichendem Maße statt (s. Abschnitt 4.1.3.).

Bei der EAE wie bei der MS besteht das T-Zellinfiltrat also hauptsächlich aus polyklonalen Zellen. Jedoch existieren Hinweise darauf, daß es sich bei einem kleinen Teil um eine Antigen-selektierte, möglicherweise für die Pathogenese bedeutsame Subpopulation handeln könnte.

### **1.9. Zielsetzung der Arbeit**

Die Frage nach dem TCR-Repertoire, der klonalen Zusammensetzung sowie den Antigen-spezifitäten von  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen ist noch immer unbeantwortet. Möglicherweise anwesende Populationen, die sich durch ein eingeschränktes TCR-Repertoire, klonale Expansion und somit durch Selektion für bestimmte Antigen-spezifitäten auszeichnen, könnten Ausdruck der zum

Zeitpunkt der Gewebsentnahme ablaufenden (u.U. für die Erkrankung ursächlichen) Aggression sein. Eine solche T-Zellpopulation ließ sich mit der in früheren Studien verwendeten Methodik nicht nachweisen (s. Abschnitte 1.8. und 4.1.3.).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiger Ansatz mit größtmöglicher Auflösung gewählt. Einzelne T-Zellen wurden aus immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitten von zwei MS-Fällen mikromanipuliert. Anschließend wurden die TCR $\beta$ -Genumlagerungen dieser einzelnen Zellen von chromosomaler DNA amplifiziert und die direkt sequenzierten V-Regionsequenzen analysiert (Roers et al., 1998). Mit dieser Technik konnte hier erstmalig festgestellt werden, daß größere TCR $\alpha\beta$  T-Zellklone in MS-Läsionen vorkommen. Zudem konnte der Anteil expandierter Klone an der Gesamtzahl der T-Zellen in der Läsion bestimmt werden. Die erhaltenen Gensequenzen wurden der CD4<sup>+</sup> oder der CD8<sup>+</sup> Subpopulation zugeordnet, und es wurde untersucht, ob sich die klonale Zusammensetzung des T-Zellinfiltrats der perivaskulären Bereiche von der des Parenchyms unterscheidet (ein vergleichende Analyse, die bisher nur in der EAE unternommen worden war; s. Abschnitt 1.8.). Darüberhinaus wurde die klonale Zusammensetzung einer aktiv demyelinisierenden mit der einer inaktiven Läsion des gleichen Falls verglichen.

Das endgültige Ziel ist es, die Antigenpezifitäten ausgewählter, in den Läsionen expandierter T-Zellklone zu bestimmen. Daher wurde in einer zweiten Phase der vorliegenden Untersuchung versucht, im Hirnmaterial des MS-Falls 2 detektierte Klone auch im Blut des Patienten nachzuweisen und diejenigen, für die dies glückte, aus dem Blut zu isolieren. In einer dritten Phase wurde ein komplementärer Ansatz verfolgt, der die Aufklärung von Antigenpezifitäten von in situ expandierten Klonen aus beiden Fällen gestatten soll. Um eine Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einzelnen mikromanipulierten T-Zellen zu ermöglichen, wurde eine Technik etabliert, die auf einer Amplifikation von 5'-cDNA-Enden (5'-RACE) basiert. Mit dieser war es möglich, für die TCR bestimmter, im ersten Teil der Arbeit anhand ihrer TCR $\beta$ -Genumlagerungen definierter T-Zellklone ihre möglichen TCR $\alpha$ -Partnerketten zu identifizieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Patienten und Gewebe

Es wurde Hirngewebe von zwei Patienten analysiert. Proben von Fall 1 wurden über Dr. R. Ravid aus der Netherlands Brain Bank (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Die Patientin verstarb im Alter von 35 Jahren an Kachexie, nachdem sie für 10 Jahre an MS mit zunächst schubhaftem, später sekundär-progressivem Verlauf gelitten hatte. Sie wurde drei Jahre vor ihrem Tod mit Kortikosteroiden behandelt sowie ein Jahr später einer anti-Tumornekrosefaktor (TNF)-Behandlung unterzogen, erhielt jedoch während ihres letzten Lebensjahrs weder Kortikosteroide noch anti-TNF oder immunsuppressive Medikamente. Zwei Gewebsblöcke periventrikulärer weißer Substanz, welche nach der Autopsie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren, standen für die vorliegende Analyse zur Verfügung (Abb. 1A). Die HLA-Genotypisierung wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. D. Albert im Labor für Immungenetik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, durchgeführt. Die Typisierung ergab: HLA-A\*2402/\*2601, -B\*1801/\*39062, -Cw\*0701/\*0702, -DRB1\*0101/\*0801, -DQA1\*0101/\*0401, -DQB1\*0501/\*0402.

Patient 2 wurde im Alter von 49 Jahren wiederholt mit linksseitiger Hemianopsie auffällig. Anhand kernspintomographischer Aufnahmen wurde ein Glioblastoma multiforme der rechtsseitigen temporookzipitalen weißen Substanz diagnostiziert (Abb. 1B). Die Läsion wurde zwei Wochen nach Auftreten der ersten Symptome in der Abteilung für Neurochirurgie der Universitätsklinik Bonn vollständig reseziert. Histopathologisch fand sich jedoch kein maligner Tumor, sondern ein großes, mit einer MS-Läsion kompatibles Areal mit entzündlicher Demyelinisierung. In der Zerebrospinalflüssigkeit fanden sich oligoklonale Immunglobuline, was die Diagnose einer ersten Manifestation der MS weiter erhärtete. Während der folgenden drei Jahre litt der Patient an zwei weiteren Schüben der Krankheit, welche mit dem Auftreten neuer, kernspintomographisch nachgewiesener demyelinisierter Läsionen einhergingen. Ein Teil des resezierten Hirngewebes wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Weiterhin wurden 12 und 31 Monate nach dem Eingriff Proben peripheren Bluts genommen, wobei der erste Blutentnahmezeitpunkt sechs Monate nach dem ersten, und der zweite 17 Monate nach dem zweiten Schub lag. "Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut" (PBMCs) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (Ficoll-Paque; Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) isoliert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryopräserviert (beides nach [Coligan et al., 1994]) oder sofort weiterverwendet (s.u.). Der Patient wird seit seinem dritten Schub mit IFN- $\beta$ 1a behandelt. Er ist mit größter Wahrscheinlichkeit homozygot für den Haplotyp HLA-A\*0101, -B\*0801, -Cw\*0701, -DRB1\*0301, -DRB3\*0101, -DQA1\*05, -DQB1\*0201, da die HLA-Genotypisierung für jeden der analysierten Loci nur jeweils ein Allel ergab. Da dieser Haplotyp in der kaukasischen Population der häufigste ist, ist Homozygotie nicht

selten. Die Verwendung des Hirnmaterials und des Bluts für Forschungszwecke erfolgte mit Einverständnis des Patienten.

In keinem der beiden Fälle war Zerebrospinalflüssigkeit für Analysen erhältlich.

## 2.2. Immunhistochemie und Zellzählungen

Serielle 10 µm-dicke Gefrierschnitte wurden auf Objektträger gebracht und luftgetrocknet. Nach jeweils 15 Schnitten wurden drei mit "Luxol-Fast-Blue", "Oil Red O" (ORO) und Hämatoxylin & Eosin nach Standardprotokollen (Romeis, 1989) gefärbt. Die Bestimmung der demyelinisierenden Aktivität der einzelnen Läsionen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Lassmann, Institut für Hirnforschung, Abteilung für Neuroimmunologie, Universität Wien, Österreich, an Gefrierschnitten (Brück et al., 1995), welche zuvor in Aceton für 10 min bei 4°C fixiert worden waren. Das Vorkommen von MOG und PLP in endozytären Vesikeln von Makrophagen sowie des entzündlichen Akutphasenmoleküls 27E10 auf der Makrophagenoberfläche zeigt eine erst kurz vor der Resektion erfolgte Phagozytose von Myelin an ([Brück et al., 1995; Brück et al., 1994; Lucchinetti et al., 1996; Ozawa et al., 1994]; s. Abb. 2). ORO<sup>+</sup> Makrophagen sind in aktiv demyelinisierenden Läsionen nachweisbar, können jedoch durchaus noch Wochen bis Monate nach dem Ende der Zerstörung der Myelinscheiden gefunden werden (Lassmann et al., 1998). Daher weist die Abwesenheit von ORO<sup>+</sup> Makrophagen darauf hin, daß die Läsion zumindest bis einige Wochen vor der Resektion inaktiv gewesen sein mußte. Als Primärantikörper wurden anti-MOG und anti-PLP ([Piddlesden et al., 1993]; beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Piddlesden, University of Cardiff, Großbritannien) sowie anti-27E10 verwendet (BMA Biomedicals, Augst, Schweiz).

Für die Mikromanipulation und Zellzählungen wurden Aceton-fixierte Schnitte, welche denen, die für die Bestimmung der Läsionsaktivität verwendet wurden, benachbart waren, mit einem der folgenden Primärantikörper für 45 min bei 22°C inkubiert: C8/144B, MT310 (beide Dako, Hamburg) bzw. OKT3 (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, USA; alternativ "rabbit-anti-human CD3"; Dako) zur Färbung von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup> T-Zellen, 6F2 (Dako) zur Färbung des sauren Gliafaserproteins (GFAP; Dako) sowie 8A3 ("βF1"; T-Cell Diagnostics, Woburn, USA) bzw. Immu510 ("pan-γ/δ"; Coulter-Immunotech Diagnostics, Marseille, Frankreich) zur Färbung von TCRαβ<sup>+</sup> bzw. TCRγδ<sup>+</sup> T-Zellen. Nach mehrmaligem Waschen mit TRIS-gepufferter Saline wurde mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei 22°C inkubiert. Für Färbungen mit C8/144B, MT310, OKT3, 8A3 und Immu510 wurden biotinylierte Fab-Fragmente eines Kaninchen-anti-Maus Antikörpers (E413), für die Färbungen mit "rabbit-anti-human CD3" und 6F2 biotinylierte Fab-Fragmente eines Schwein-anti-Kaninchen Antikörpers (E431; beide Dako) eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte eine Inkubation mit Streptavidin-Biotin-gekoppelter alkalischer Phosphatase

(K391, Dako) für 30 min bei 22°C. Die gebundene alkalische Phosphatase wurde nach erneutem Waschen durch eine Inkubation mit dem Substrat Fast Red TR (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) sichtbar gemacht. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Meyer's Hämalaun-Lösung für 5 min bei 22°C gegengefärbt (Romeis, 1989).

Zur Bestimmung der relativen Zellzahlen im Gewebe wurden jeweils 300–800 CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> positive parenchymale T-Zellen bzw. 100–400 positive perivaskuläre T-Zellen einer seriellen Schnittserie gezählt. CD4<sup>+</sup> Zellen mit Makrophagenmorphologie wurden ausgeschlossen. In Fall 1 wurde das CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>Verhältnis nur für die Läsionen 3 und 4 bestimmt, da in den parenchymalen Bereichen der Läsionen 1 und 2 zwar zahlreiche CD8<sup>+</sup>, jedoch kaum CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden waren (Abb. 1A). In beiden Fällen wurde das Zählen von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den perivaskulären Infiltraten durch das Vorhandensein von CD4<sup>+</sup> Makrophagen sowie durch hohe Zelldichten erschwert. Daher verstehen sich die im Ergebnisteil genannten Werte als Schätzungen.

### 2.3. Mikromanipulation von Zellen aus Gefriergewebe

Zur Mikromanipulation von Einzelzellen für die Amplifikation von TCRβ-Genumlagerungen auf chromosomaler DNA (s. Abschnitt 2.4.) wurden, um den Gewebeverband zu lockern, immungefärbte Gefrierschnitte mit 5 mg/ml Kollagenase H (Roche, Mannheim) in TRIS-gepufferter Saline für ca. 30 min bei 22°C inkubiert. Es wurde unter einem Inversmikroskop (Olympus, Hamburg) mit 600facher Vergrößerung mikromanipuliert. Einzelne Zellen bzw. kleine Gruppen von Zellen wurden mit Hilfe einer über hydraulische Mikromanipulatoren gesteuerten Glaskapillare (Narishige, Tokyo, Japan) mobilisiert und in eine zweite, gleichermaßen steuerbare Kapillare aufgesaugt (Küppers et al., 1993). Die isolierten Zellen wurden dann in dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße mit je 20 µl "Expand HF PCR"-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> und 1 ng/µl 5S rRNA (beides Roche) transferiert und bei -80°C gelagert.

Zur Mikromanipulation von Zellen für die 5'-RACE (s. Abschnitt 2.14.) wurden 10 µm-Schnitte einer Tonsille (zur Etablierung der Technik; bezogen aus der Klinik St. Elisabeth, Köln) oder der oben verwendeten Gewebelöcher der Fälle 1 und 2 auf Objektträger, die mit einer 1,4 µm dünnen Polyethylenfolie (PALM, Bernried) beschichtet waren, gebracht und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden mit Meyer's Hämalaun-Lösung und 50 U/ml "Prime RNase Inhibitor" (Eppendorf, Hamburg) gefärbt und erneut luftgetrocknet. Die Mikrodissektion erfolgte Laser-vermittelt mit Hilfe des "Robot-MicroBeam" (PALM; ausgestattet mit 337 nm-Stickstofflaser, Mikromanipulator und Inversmikroskop [Zeiss, Oberkochen]) mit 400facher Vergrößerung nach Angaben des Herstellers bzw. wie von Schütze et al. (Schütze und Lahr, 1998) beschrieben. Die ausgeschnittenen Proben wurden bei einer Größe von >10 Zellen Laser-

vermittelt in den Deckel eines invertierten, genau über dem Schnitt positionierten PCR-Gefäßes mit 10 µl 1 x "Superscript II First Strand Buffer", 10 mM Dithiothreitol (beides Life Technologies, Karlsruhe), 0,5% NP-40 (Sigma-Aldrich), 1 ng/µl 5S rRNA und 5 U RNAGuard (Amersham-Pharmacia Biotech) katapultiert. Hingegen wurden Proben mit  $\leq 10$  Zellen mittels einer am Mikromanipulator befestigten Akupunkturnadel (0,16 x 30 mm; Seirin, Dietzenbach) in den Gefäßdeckel transferiert. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4. Amplifikation von TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus Einzelzellen auf chromosomaler DNA**

TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus Einzelzellen wurden mittels einer sogenannten "semi-nested" PCR über zwei Runden amplifiziert (Roers et al., 1998). 24 Oligonukleotide, welche die Segmente aller ausprägbarer BV-Genfamilien (Arden et al., 1995) zu amplifizieren im Stande sind, dienten in beiden Runden der Amplifikation als 5'-gelegene Primer (Tabelle I; es wurde die TCRBV-Nomenklatur von Arden et al. (1995) verwendet). Acht äußere BJ-spezifische Oligonukleotide ("3'"), welche die Amplifikation von Umlagerungen aller 13 BJ-Gensegmente erlauben, wurden als 3'-gelegene Primer in der ersten Runde verwendet (Tabelle I). Alle 32 Primer wurden in der ersten Runde in einem Reaktionsansatz eingesetzt. In der zweiten Runde der Amplifikation kamen acht innere 5'-gelegene BJ-spezifische Oligonukleotide ("5'") zum Einsatz (Tabelle I). Hierbei erlauben die BJ-Primer, welche für die BJ-Segmente 1S2, 1S3, 1S5, 1S6, 2S2, 2S3, 2S6 und 2S7 spezifisch sind, auch die Amplifikation von Umlagerungen der restlichen (im Locus dazwischenliegenden) BJ-Segmente. Die Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen; die Erstrundenprimer besaßen die Qualität "single cell".

Die Einzelzellen wurden in 20 µl PCR-Puffer (s. Abschnitt 2.3.) bei  $50^{\circ}\text{C}$  für 2 h mit 0,25 mg/ml Proteinase K (Life Technologies) inkubiert. Das Enzym wurde nachfolgend bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 10 min hitzeinaktiviert. Die erste Runde der Amplifikation fand im gleichen Reaktionsgefäß in 1x "Expand HF Puffer" (Roche), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 µM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP (Amersham-Pharmacia Biotech), 42 nM je BV- und 3'BJ-Primer sowie 2,5 U des "Expand HF Polymerase Mixes" (Roche) statt. Ein erster Zyklus mit  $95^{\circ}\text{C}$  für 2 min, einer Pause auf  $80^{\circ}\text{C}$ , während der das Enzym zugegeben wurde,  $61^{\circ}\text{C}$  für 30 s und  $72^{\circ}\text{C}$  für 50 s wurde gefolgt von 35 Zyklen mit  $95^{\circ}\text{C}$  für 1 min,  $61^{\circ}\text{C}$  für 30 s und  $72^{\circ}\text{C}$  für 50 s sowie einer einmaligen Inkubation bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 5 min.

**Tabelle I. Sequenzen der Oligonukleotide zur Amplifikation von TCR $\beta$ -Genumlagerungen.**

BV1/5	5'-ACA-GCA-AGT-GAC-DCT-GAG-ATG-CTC-3'
BV2	5'-GAG-TGC-CGT-TCC-CTG-GAC-TTT-CAG-3'
BV3	5'-GTA-ACC-CAG-AGC-TCG-AGA-TAT-CTA-3'
BV4	5'-TCC-AGT-GTC-AAG-TCG-ATA-GCC-AAG-TC-3'
BV6.1	5'-ATG-TAA-CTY-TCA-GGT-GTG-ATC-CAA-3'
BV6.2	5'-GTG-TGA-TCC-AAT-TTC-AGG-TCA-TAC-3'
BV7	5'-TAC-GCA-GAC-ACC-AAR-ACA-CCT-GGT-CA-3'
BV8	5'-GGT-GAC-AGA-GAT-GGG-ACA-AGA-AGT-3'
BV9	5'-CCC-AGA-CTC-CAA-AAT-ACC-TGG-TCA-3'
BV10	5'-AAG-GTC-ACC-CAG-AGA-CCT-AGA-CTT-3'
BV11	5'-GAT-CAC-TCT-GGA-ATG-TTC-TCA-AAC-C-3'
BV12	5'-CCA-AGA-CAC-AAG-GTC-ACA-GAG-ACA-3'
BV13	5'-GTG-TCA-CTC-AGA-CCC-CAA-AAT-TCC-3'
BV14	5'-GTG-ACC-CAG-AAC-CCA-AGA-TAC-CTC-3'
BV15	5'-GTT-ACC-CAG-ACC-CCA-AGG-AAT-AGG-3'
BV16	5'-ATA-GAA-GCT-GGA-GTT-ACT-CAG-TTC-3'
BV17	5'-CAC-TCA-GTC-CCC-AAA-GTA-CCT-GTT-3'
BV18	5'-TGC-AGA-ACC-CAA-GAC-ACC-TGG-TCA-3'
BV19	5'-ACA-AAG-ATG-GAT-TGT-ACC-CCC-GAA-3'
BV20	5'-GTC-AGA-TCT-CAG-ACT-ATT-CAT-CAA-TGG-3'
BV21	5'-CAG-TCT-CCC-AGA-TAT-AAG-ATT-AYA-GAG-3'
BV22	5'-GGT-CAC-ACA-GAT-GGG-ACA-GGA-AGT-3'
BV23	5'-CTG-ATC-AAA-GAA-AAG-AGG-GAA-ACA-GCC-3'
BV24	5'-CAA-GAT-ACC-AGG-TTA-CCC-AGT-TTG-3'
3'BJ1.2	5'-TAC-AAC-GGT-TAA-CCT-GGT-CCC-CGA-3'
5'BJ1.2	5'-TAA-CCT-GGT-CCC-CGA-ACC-GAA-GG-3'
3'BJ1.3	5'-CAC-CTA-CAA-CAG-TGA-GCC-AAC-TT-3'
5'BJ1.3	5'-GCC-AAC-TTC-CCT-CTC-CAA-AAT-ATA-TGG-3'
3'BJ1.5	5'-CCA-ACT-TAC-CTA-GGA-TGG-AGA-GTC-GA-3'
5'BJ1.5	5'-GAT-GGA-GAG-TCG-AGT-CCC-ATC-AC-3'
3'BJ1.6	5'-CCT-GGT-CCC-ATT-CCC-AAA-GTG-GA-3'
5'BJ1.6	5'-CCC-ATT-CCC-AAA-GTG-GAG-GGG-TG-3'
3'BJ2.2	5'-CCT-TAC-CCA-GTA-CGG-TCA-GCC-TA-3'
5'BJ2.2	5'-AGT-ACG-GTC-AGC-CTA-GAG-CCT-TCT-3'
3'BJ2.3	5'-TCC-CGG-GGC-GCC-CCC-TCC-CCA-GTT-3'
5'BJ2.3	5'-GAG-CCC-CCG-CTT-ACC-GAG-CAC-TGT-CA-3'
3'BJ2.6	5'-CAG-CCG-CCG-CCT-TCC-ACC-TGA-AT-3'
5'BJ2.6	5'-CCG-GCC-CCG-AAA-GTC-AGG-ACG-TT-3'
3'BJ2.7	5'-TCC-ATC-GTT-CAC-CTT-CTC-TCT-AAA-CA-3'
5'BJ2.7	5'-GCC-CGA-ATC-TCA-CCT-GTG-ACC-GTG-3'

Die Primer BV7, BV9 und BV18 kreuzreagieren jeweils mit Mitgliedern aller drei V $\beta$ -Familien. Jedes dieser Oligonukleotide wurde im Reaktionsmix in einer Konzentration von nur einem Drittel (14 nM) im Vergleich zu der der anderen Oligonukleotide eingesetzt.

Für die zweite Runde der Amplifikation wurden je 1  $\mu$ l des Erstrundenprodukts zu acht einzelnen Reaktionsansätzen, jeweils bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen von BV-Primern und einer Mischung der acht 5'BJ-Primer, gegeben. Es wurden die folgenden Kombinationen von BV-Primern für die Reaktionsansätze der zweiten Runde verwandt: BV2, 3 und 22; BV4, 6.1 und 14; BV6.2, 8 und 21; BV1/5, 11 und 12; BV13 und 15; BV17, 20 und 9/7/18; BV23 und 24; BV10, 16 und 19. Die Zweitundenansätze enthielten 20 mM TRIS-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 150 nM je Primer sowie 1,25 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies). Die Reaktion fand in 96-Napf-Platten statt, begann mit einem Zyklus mit 95°C für 3 min, 61°C für 30 s, 72°C für 1,5 min gefolgt von 44 Zyklen mit

95°C für 1 min, 61°C für 30 s und 72°C für 1 min und wurde mit einer einmaligen Inkubation bei 72°C für 5 min beendet.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel. Im Falle einer positiven Reaktion wurde die Zweitrundenreaktion wiederholt, nun jedoch unter Verwendung der einzelnen BV-Primer in separaten Reaktionsansätzen, um denjenigen Primer zu identifizieren, welcher zuvor die Generierung des PCR-Produkts ermöglicht hatte.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden vorbeugend Maßnahmen ergriffen, wie das Arbeiten mit Handschuhen (die häufig gewechselt wurden), die regelmäßige Bestrahlung der Arbeitsflächen mit Ultraviolettlicht sowie das Ausführen von Mikromanipulation, erster und zweiter PCR-Runden in separaten Räumlichkeiten unter Verwendung separater Pipetten.

## 2.5. Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in einem 2,5%igen Agarosegel und mit Hilfe des "Qiaex II-Kits" zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Qiagen, Hilden) gereinigt und unter Verwendung des "ABI-PRISM Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits" und des automatischen Sequenzierers ABI 377 (beides Perkin Elmer, Foster City, USA) direkt sequenziert. Die Auswertung der Gensequenzen erfolgte mit Hilfe der DNASIS Software (Amersham-Pharmacia Biotech). Die Sequenzdaten finden sich in den EMBL/GenBank/DDBJ-Datenbanken unter den Bezeichnungen AJ405646-AJ405872.

## 2.6. Sortierung von T-Zellen aus peripherem Blut

Für die Positivkontrollen der Einzelzell-PCR bzw. der 5'-RACE wurden PBMCs von fünf gesunden Spendern kaukasischen Ursprungs mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. Abschnitt 2.1) isoliert und mit monoklonalen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markierten anti-CD3- (Becton-Dickinson, Heidelberg) und Phycoerythrin (PE)-markierten anti-TCR $\alpha\beta$  (Coulter-Immunotech Diagnostics) Antikörpern gefärbt (Coligan et al., 1994). Einzelne TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> Zellen wurden mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) unter Verwendung eines FACS 440 (Becton-Dickinson) in PCR-Gefäße mit 20  $\mu$ l "Expand HF PCR-Puffer" ohne MgCl<sub>2</sub> und 1 ng/ $\mu$ l 5S rRNA sortiert und bei -80°C gelagert. Tote Zellen wurden von der Analyse durch Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen (Coligan et al., 1994).

Für das CDR3 Spectratyping (s. Abschnitt 2.7.) wurden PBMCs aus Blut des Patienten 2 (Fall 2), welches 12 bzw. 31 Monate nach der Hirnbiopsie gewonnen worden war (Proben "12 mo" und "31 mo"), mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3-

FITC (SK7, Becton-Dickinson) und anti-CD4-PE (MT310, Dako) oder anti-CD8-PE (DK25, Dako) gefärbt. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen wurden mittels FACS in Eppendorf-Gefäße mit RPMI 1640-Medium (Life Technologies; supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum [Roche]) sortiert. Die Gefäße waren während des Sortierens auf 4°C gekühlt. PBMCs der Blutprobe “12 mo” waren vor den Färbe- und Sortierprozeduren kryopräserviert worden.

Für die spezifische Amplifikation der TCR $\beta$ -Genumlagerungen der Klone 2, 3 und 8 (“Klon 2-”, “3-” und “8-spezifische PCR”; s. Abschnitt 2.11.) wurden kryopräservierte PBMCs aus den Blutproben “12 mo” und “31 mo” des Patienten 2 mit anti-CD8-PE- (DK25, Dako) und Allophykozyanin-markiertem anti-CD45RO (UCHL-1, Becton-Dickinson) Antikörpern gefärbt. Jeweils 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen wurden in PCR-Gefäße sortiert.

### **2.7. “CDR3 Spectratyping” der TCR $\beta$ -Transkripte von T-Zellen aus peripherem Blut**

Gesamt-RNA wurde mittels Trizol (Life Technologies) aus 10<sup>5</sup> (Probe “12 mo”) und 2 x 10<sup>5</sup> (Probe “31 mo”) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen isoliert und cDNA unter Verwendung von oligo-(dT)-Primern revers transkribiert. Die cDNA-Synthese und die “CDR3 Spectratyping”-Analyse wurden von Dr. N. Goebels in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Hohlfeld, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neuroimmunologie, Martinsried, wie bei Goebels et al. beschrieben (Goebels et al., 2000), ausgeführt. Hierbei wurde TCRBV-Familien-spezifische PCR in 26 separaten Reaktionsansätzen mit der cDNA als Vorlage durchgeführt, wobei jeder Ansatz einen von 26 TCRBV-Familien-spezifischen Primern und einen TCRBC-spezifischen Primer (Monteiro et al., 1996) enthielt. Je eines von 13 fluoreszenzmarkierten TCRBJ-spezifischen Oligonukleotiden (Puisieux et al., 1994) diente als Primer für die sogenannte “Runoff”-Reaktion; “Runoff”-Produkte wurden von jedem BV-spezifischen PCR-Produkt generiert. Die Transkripte wurden auf einem Sequenziergel aufgetrennt und die Fluoreszenzintensitäten der Banden mit einem automatischen DNA-Sequenzierer gemessen.

Anschließend wurden BV-BJ-Subpopulationen von Interesse (s.u.) gezielt amplifiziert, nämlich mit Hilfe von BV- und BJ-spezifischen Primern und dem ursprünglichen BV-BC-Amplifikationsprodukt als Vorlage, und direkt sequenziert (Goebels et al., 2000). Dabei konnte immer dann eine im Bereich der CDR3-Region lesbare Sequenz erhalten werden, wenn die Population der TCR $\beta$ -mRNA-Moleküle, die von der BV-BJ-Primerkombination amplifiziert wurde, von einem einzigen klonalen Transkript dominiert worden war. Von Interesse waren im Rahmen dieser Untersuchung einerseits alle BV-BJ-Subpopulationen, die im Hirnmaterial als klonal expandiert erkannt worden waren, andererseits all diejenigen, deren Spektragramme stark dominante Peaks zeigten

und die zugleich im Hirnmaterial mit wenigstens einem Vertreter erhalten worden waren.

## 2.8. Klonierung von PCR-Produkten

Die BV14-BJ1S1-Subpopulation wurde mit Hilfe des entsprechenden Primerpaars und mit cDNA von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen als Vorlage amplifiziert. Das frisch amplifizierte PCR-Produkt wurde unter Verwendung des "Original TA Cloning Kits" (Invitrogen, Groningen, Niederlande) nach Anweisung des Herstellers in den Vektor pCR2.1 kloniert. Aus willkürlich ausgewählten Bakterienkolonien wurde mit dem "Qiagen Plasmid Mini Kit" (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers Plasmid-DNA isoliert. Die Sequenzierung der in den Vektor eingefügten DNA erfolgte mit dem BV14-spezifischen Primer.

## 2.9. Herstellung von Jurkat-Kontrollzellen für die klonspezifische PCR

Um die spezifische Amplifikation der TCR $\beta$ -Genumlagerungen der Klone 2, 3 und 8, welche in Hirngewebe von Fall 2 identifiziert worden waren, etablieren und positiv kontrollieren zu können, wurden Zelllinien generiert, die genau eine Kopie jeder TCR $\beta$ -Umlagerung stabil in ihr Genom integriert trugen. Das PCR-Produkt jeder Umlagerung (Klon 2: BV4S1-BJ2S6, Länge: 260 Basenpaare [Bp]; Klon 3: BV13S2/9-BJ2S1, Länge: 530 Bp; Klon 8: BV13S3-BJ2S1, Länge: 530 Bp) wurde zunächst in den Vektor pCR2.1 kloniert (s. Abschnitt 2.8.) und danach in den Vektor pRc/CMV (Invitrogen) umklontiert (Ausubel et al., 1997). Die Integrität der Primerbindestellen (s. Abschnitt 2.11.) wurde durch beidseitige Sequenzierung (unter Verwendung der entsprechenden BV- und BJ-Primer; s. Abschnitt 2.5.) verifiziert. Die mit Hilfe der Restriktionsendonuklease HindIII (Roche) linearisierten Vektoren wurden in je  $4 \times 10^6$  Jurkat-Zellen (einer humanen T-Zelleukämie entstammende Zelllinie; zur Verfügung gestellt von Dr. M. Schreier, Novartis, Basel, Schweiz) mittels DMRIE-C-Transfektionsreagenz (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^4$  pro Napf in 96-Napf-Platten ausgesät und für fünf Wochen unter 1 mg/ml G418 (Geneticin, Life Technologies) selektioniert, um stabile Integrianten zu erhalten.

## 2.10. Southern-Blot-Analyse

Zur Identifizierung von Jurkat-Klonen (Kontrollzellen für die klonspezifische PCR, s. Abschnitte 2.9. bzw. 2.11.), die nur eine einzige Kopie des transfizierten Vektors trugen, wurde nach der G418-Selektion genomische DNA aus einzelnen Jurkat-Klonen

durch Inkubation mit Proteinase K und Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und mit der Restriktionsendonuklease SmaI (New England Biolabs, Frankfurt/M.) verdaut (beides [Ausubel et al., 1997]). Die verdauten DNA (etwa 15 µg DNA) wurden in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt und durch alkalinen Transfer auf Hybond N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham-Pharmacia Biotech) transferiert (Ausubel et al., 1997). Zur Herstellung der Probe wurde das Neomycin-Resistenzgen unter Verwendung von SfuI und SmaI aus dem Vektor pRc/CMV ausgeschnitten und mit Hilfe des "Gene Images Random Prime Labelling Module" (Amersham-Pharmacia Biotech) nach Herstellerprotokoll mit Fluoreszein-11-dUTP markiert (Probe "Neo", Länge 870 Bp). Die Hybridisierung, die Waschschriffe sowie der Nachweis der gebundenen Probe mittels eines anti-Fluoreszein-Alkalische-Phosphatase-Konjugats und des Chemolumineszenz-Substrats "CDP-Star" des Kits "Gene Images CDP-Star Detection Module" (Amersham-Pharmacia Biotech) wurden nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Southern-Strategie ist in Abb. 6 erläutert.

### 2.11. Klonspezifische PCR

Um die jeweilige Sensitivität der Klon 2-, 3- und 8-spezifischen PCR zu ermitteln (beispielsweise für die besondere Situation, in der nur eine einzige von bis zu 10<sup>3</sup> Zellen eine Kopie der klonalen Umlagerung trägt), wurden einzelne Jurkat-Kontrollzellen in PCR-Gefäße mit 10<sup>3</sup> irrelevanten, von einem gesunden Spender stammenden TCRαβ<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T-Zellen und 20 µl "Expand HF PCR-Puffer" ohne MgCl<sub>2</sub> und 1 ng/µl 5S rRNA sortiert (s. Abschnitt 2.6.). Für die erste und zweite Runde der Amplifikation der klonalen V-Regionen dienten die BV4- (Klon 2) und BV13- (Klone 3 und 8) spezifischen Oligonukleotide (s. Tabelle I) als 5'-gelegene Primer. Als spezifische Primer für die klonalen CDR3-Regionen wurden die folgenden verwendet (3'-gelegene Primer für die erste, 5'-gelegene Primer für die zweite Runde): 5'-GTCAGGACGTTGGCCCCAGAAA-3' (Klon 2, 3'-gelegen), 5'-AGGACGTTGGCCCCAGAAACCT-3' (Klon 2, 5'-gelegen), 5'-CCGAAGAAGCTGCTCATTGTAGGTG-3' (Klon 3, 3'-gelegen), 5'-AGAAGCTGCTCATTGTAGGTGGCAA-3' (Klon 3, 5'-gelegen), 5'-CCCGAAGAAGCTGCTCATTGTATTG-3' (Klon 8, 3'-gelegen), and 5'-GAAGAAGCTGCTCATTGTATTGCGC-3' (Klon 8, 5'-gelegen).

Nach Inkubation mit 0,5 mg/ml Proteinase K für 2 h bei 50°C gefolgt von einem Hitzeinaktivierungsschritt von 10 min bei 95°C wurden die Proben im gleichen Reaktionsgefäß in 1 x "Thermophilic DNA Polymerase Buffer" (Promega, Mannheim), 100 µM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 42 nM je Primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> im Fall der Klon 2- bzw. Klon 3-spezifischen PCR oder 2 mM MgCl<sub>2</sub> im Fall der Klon 8-spezifischen PCR und 2,5 U "Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A" (Promega) einer ersten Runde der Amplifikation unterzogen. Einem ersten Zyklus mit 95°C für 2 min, einer Pause bei 80°C, während der Taq zugegeben wurde, 70°C für 30 s und

72°C für 50 s folgten 34 Zyklen mit 95°C für 60 s, 70°C für 30 s und 72°C für 50 s sowie ein 5-minütiger Inkubationsschritt bei 72°C.

Die Bedingungen für die zweite Runde der Amplifikation waren die folgenden: 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 100 µM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 150 nM je Primer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> im Fall der Klon 2- bzw. Klon 3-spezifischen PCR oder 4 mM MgCl<sub>2</sub> in der Klon 8-spezifischen PCR, 1 µl des Erstrundenprodukts und 1,3 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies) wurden einem Zyklus mit 95°C für 3 min, 70°C für 30 s, 72°C für 90 s gefolgt von 44 Zyklen mit 95°C für 60 s, 70°C für 30 s, 72°C für 60 s und einer einmaligen Inkubation bei 72°C für 5 min unterzogen.

Die Ergebnisse der Etablierungsversuche sind in Abschnitt 3.2.2. zusammengefaßt. Die PCR-Produkte von je fünf von jeder klonspezifischen PCR willkürlich ausgewählten Proben wurden sequenziert (s. Abschnitt 2.5.); bei einer jeden handelte es sich um die entsprechende klonale Umlagerung. In keinem Fall wurde ein spezifisches Produkt von Proben mit irrelevanten T-Zellen in Abwesenheit einer entsprechenden Jurkat-Kontrollzelle erhalten.

Für die eigentliche Untersuchung der Blutproben "12 mo" und "31 mo" des Patienten 2 wurden Proben mit je 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen (s. Abschnitt 2.6.) einer Klon 2-, 3- oder 8-spezifischen PCR unterzogen. Proben mit Jurkat-Kontrollzellen, die die entsprechende Umlagerung trugen (je zwei pro Reaktionsgefäß), plus 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Zellen eines gesunden Spenders wurden als Positivkontrollen parallel analysiert. Es wurden alle aus den Testreaktionen erhaltenen PCR-Produkte sequenziert.

Für die Klon 10-spezifische PCR (s. Abschnitt 2.13.) wurde das BV14-spezifische Oligonukleotid (Tabelle I) als 5'-gelegener Primer sowie das Oligo 5'-TCAGTGTTCCCTATTCCCCCT-3' als 3'-gelegener, für die klonale CDR3-Region spezifischer Primer eingesetzt. Die PCR-Bedingungen entsprachen den in diesem Abschnitt für die zweite Runde der Amplifikation beschriebenen; allerdings wurde ≈1 µg genomische DNA der zu analysierenden Proben als Vorlage eingesetzt und mit einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2 mM sowie 30 Zyklen gearbeitet.

Zur Bestimmung der Sensitivität dieser PCR wurden die folgenden "Spiking"-Experimente durchgeführt. Die V-Region des Klons 10 wurde mit Hilfe des BV14-spezifischen Oligonukleotids als 5'-gelegenen Primer sowie des Oligos 5'-ACTGTGAGTCTGGTGCCTTGT-3' als 3'-gelegenen, BJ1S1-spezifischen Primer (Puisieux et al., 1994) unter den in Abschnitt 2.4. für die zweite Runde der Amplifikation genannten Bedingungen amplifiziert. Erstrundenprodukt des Klons 10 diente hierbei als Vorlage (s. Abschnitt 2.4.). BV14<sup>+</sup> V-Regionsequenzen (als "Hintergrund-DNA") wurden von 1 µg genomischer DNA aus PBMCs eines gesunden Spenders mit dem BV14-spezifischen Oligonukleotid als 5'-gelegenen und einer Mischung der BJ-spezifischen Oligos (5'BJ-Primer aus Tabelle I) als 3'-gelegene Primer unter denselben PCR-Bedingungen amplifiziert. Nach Abschätzen der Mengen beider Spezies von PCR-Produkten im Agarosegel wurden Mischungen mit unter-

schiedlichen Mengenverhältnissen beider Produkte hergestellt, welche als Vorlage für die Klon 10-spezifische PCR dienten. Bei Einsatz von 2,4 pg "Hintergrund-DNA" konnten noch 2,4 fg DNA der V-Region des Klons 10 nachgewiesen werden.

Für die Klon-8-spezifische PCR auf genomischer DNA (s. Abschnitt 2.13.) wurde wie oben für die zweite Runde beschrieben verfahren; allerdings wurde  $\approx 1 \mu\text{g}$  genomische DNA der zu analysierenden Proben eingesetzt und mit 30 Zyklen gearbeitet.

## 2.12. In-vitro-Aktivierung, Expansion und Selektion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Das Aktivierungsprotokoll mit anti-TCRBV- und anti-CD28-Antikörpern wurde (Maccalli et al., 1997) entnommen und modifiziert. 96-Napf-Gewebekulturplatten mit Rundböden wurden mit Ziege-anti-Maus-IgG ("Fc-specific"; Sigma-Aldrich) beschichtet, indem diese über Nacht bei 4°C mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des Antikörpers in Phosphat-gepufferter Saline (Life Technologies) inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit Hank`s gepufferter Salzlösung (Life Technologies) erfolgte eine Inkubation für 40 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-BV14- (CAS1.1.3; Coulter-Immunotech Diagnostics) bzw. 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3- (SPV-T3b; Zymed, San Francisco, USA) und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD28- (L293 "Camfolio"; Becton-Dickinson) monoklonalen Antikörpern in RPMI-10 (RPMI 1640 mit Na-Bicarbonat supplementiert mit 1% L-Glutamin, 1% Na-Pyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, 1% Kanamycin, 100 U Penicillin/Streptomycin [alles Life Technologies],  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol [Merck, Darmstadt] und 10% humanem "AB-"Serum [0,8  $\mu\text{m}$ -filtriert, nicht hitzeinaktiviert; PromoCell, Heidelberg]). Abschließend wurde dreimal mit Hank`s gepufferter Salzlösung gewaschen.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus zuvor kryopräservierten T-Zellen eines gesunden Spenders oder der Blutprobe "12 mo" (Fall 2) mittels "Magnetic activated cell sorting" (MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) unter Verwendung von "CD8 Micro-Beads" nach Herstellerprotokoll angereichert. Die Reinheit der Zellpräparationen wurde mittels Standard-FACS-Analyse (Coligan et al., 1994) auf einem FACScalibur-Durchflußzytometer (Becton-Dickinson) überprüft und war routinemäßig bei  $\geq 95\%$ . Die Zellen wurden nach Bestimmung der Lebendzellzahl ( $\geq 75\%$  lebende Zellen bei zuvor kryopräservierten Zellen; ermittelt nach der Trypanblauausschlußmethode [Coligan et al., 1994]) in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  oder  $1,3 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI-10 in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  zu jedem Napf gegeben. Hierbei wurden die Zellen auf Nöpfe verteilt, die mit anti-BV14/anti-CD28- (zur selektiven Anreicherung und Expansion von TCRBV14<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen [Maccalli et al., 1997]) oder mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern (für die mutmaßliche Expansion aller T-Zellen) beschichtet worden waren.

Nach einwöchiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die stark proliferierenden Zellen der anti-BV14/anti-CD28-Kultur auf zwei gleichermaßen beschichtete Näpfe einer 96-Napfplatte verteilt und mit RPMI-10 plus 100 U/ml (Endkonzentration) rekombinantes IL-2 (Proleukin; Chiron, Ratingen) restimuliert. Nach etwa einer weiteren halben Woche erfolgte ein Umsetzen der Zellen auf beschichtete 48-Napfplatten und Kultivierung in RPMI-10 plus 100 U/ml IL-2. Nach insgesamt zwei bis drei Wochen wurden die Zellen auf beschichtete 24-Napfplatten verteilt und in RPMI-10 plus 500 U/ml IL-2 restimuliert. Die schneller wachsenden Zellen der anti-CD3/anti-CD28-Kulturen wurden nach 6, 8 und 12 Tagen entsprechend umgesetzt und bereits nach dem ersten Umsetzen in RPMI-10 plus 500 U/ml IL-2 kultiviert. Alle Zellen wurden weiterhin unter den letztgenannten Bedingungen kultiviert; das Umsetzen erfolgte immer dann, nachdem die Zellen die Napfböden völlig bedeckt hatten.

Mittels MACS angereicherte Zellen sowie Zellen von Tag 18 (Patient 2) bzw. Tag 21 (gesunder Spender) der Kultur wurden mit anti-CD8-FITC- (DK25, Dako), anti-CD4-PE- (MT310, Dako) und anti-BV14-PE-Antikörpern (CAS1.1.3; Coulter-Immunotech Diagnostics) gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Im Falle der Patientenkulturen wurden an den Tagen 13 und 23 Zellen zur Präparation genomischer DNA für die Klon 8- und Klon 10-spezifische PCR (s. Abschnitt 2.11.) entnommen.

### **2.13. Generierung von CD8<sup>+</sup> T-Tellinien/-klonen durch Grenzverdünnung**

Das Protokoll für die Klonierung von humanen T-Zellen aus Primärkulturen wurde freundlicherweise von Dr. F. Sallusto, Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Schweiz, zur Verfügung gestellt und kam in modifizierter Form zur Anwendung. T-Zellen aus dreiwöchigen Expansionskulturen (s. Abschnitt 2.12.) wurden in einer Konzentration von 1500 bzw. 150 Zellen/ml in RPMI-10 plus 5000 U/ml IL-2, 1 µg/ml Phytohämagglutinin ("HA 16"; Abbott, Wiesbaden) sowie mit 50 Gy bestrahlte "Feederzellen" (PBMCs eines gesunden Spenders; 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) in 96-Napf-Gewebekulturplatten mit Rundböden à 20 µl (entsprechend 30 bzw. 3 T-Zellen per Napf) aliquotiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach vier Tagen wurden jedem Napf 20 µl, nach weiteren sechs Tagen 40 µl RPMI-10 plus 5000 U/ml IL-2 und 1 µg/ml Phytohämagglutinin zugegeben. Etwa an Tag 15 wurden die Zellen der positiven Näpfe auf mit anti-BV14/anti-CD28- bzw. anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern beschichtete 96-Napf-Platten umgesetzt und wie unter Abschnitt 2.12. beschrieben expandiert. Nach Bedarf wurden Zellaliquots zur Extraktion genomischer DNA (für Klon 8- und 10-spezifische PCR; s. Abschnitt 2.11.) im 96-Napf-Format nach Ramirez-Solis et al. gewonnen (Ramirez-Solis et al., 1992).

Die Klonierungseffizienzen betragen in zwei unabhängigen Experimenten durchschnittlich 95% bei 30 ausgesäten T-Zellen pro Napf und 53% (mit anti-BV14/anti-CD28 expandiert) bzw. 28% (mit anti-CD3/anti-CD28 expandiert) bei 3 T-Zellen pro

Napf, was in etwa den Effizienzen, die in Etablierungsexperimenten mit T-Zellen eines gesunden Spenders erhalten worden waren, entspricht.

#### **2.14. 5`-RACE basierend auf dem "Template-Switching"-Effekt und der "Step-Out-PCR"**

Um zugleich TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einer einzigen T-Zelle amplifizieren zu können, wurde eine 5`-RACE-Methode (Matz et al., 1999) auf dem Niveau einzelner Zellen etabliert. Dazu wurden einzelne T-Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders in PCR-Gefäße mit je 10  $\mu$ l 1 x "Superscript II First Strand Buffer", 10 mM Dithiothreitol, 0,5% NP-40, 1 ng/ $\mu$ l 5S rRNA und 5 U RNAGuard sortiert (s. Abschnitt 2.6.) und bei -80°C gelagert. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem "PUREscript RNA Isolation Kit" (Gentra Systems, Minneapolis, USA) mit modifiziertem Protokoll. Nach Auftauen der Proben auf 4°C wurde der Inhalt mit 30  $\mu$ l "Cell Lysis Solution" gemischt und 10  $\mu$ l "Protein-DNA Precipitation Solution" zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf 4°C wurde für 5 min bei 10<sup>4</sup> Umdrehungen/min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß transferiert und 30  $\mu$ l 100% Isopropanol (Merck) sowie 2  $\mu$ g Glykogen (Roche) zugegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet einmal mit 70% Ethanol (Merck) gewaschen. Nach Lufttrocknung für 5 min wurde das Pellet in 7  $\mu$ l 1 mM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 10 mM Dithiothreitol, 5 U RNAGuard, 500 nM "template-switch" (TS)-Oligo 5`-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3` (die oligo(G)-Sequenz am 3`-Ende mit Riboserückgrat) sowie je 200 nM TCRAC-Segment-spezifisches Oligo 5`-GCGAGGGAGCACAGG-3` und TCRBC-Segment-spezifisches Oligo 5`-AAGCCACAGTCTGCTCTA-3` gelöst (sämtliche Konzentrationen bezogen auf ein Volumen von 10  $\mu$ l) und für 30 min bei 4°C inkubiert. Alle in der vorliegenden Analyse verwendeten TCRBC-spezifischen Oligos sind in der Lage, beide ausprägbaren C-Segmente (C1 und C2) spezifisch zu erkennen.

Nach Erhitzen der Mixtur auf 70°C für 2 min und raschem Kühlen auf 4°C wurden 5 U RNAGuard, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche), 1 x "Superscript II First Strand Buffer" sowie 60 U "Superscript II" reverse Transkriptase zugegeben und bei 48°C für 20 min, 42°C für 20 min und 70°C für 5 min inkubiert. Alle Komponenten waren RNase-frei.

Die erste Runde der Amplifikation (TCR $\alpha$ - und  $\beta$ -spezifische PCR dabei in getrennten Ansätzen) fand statt in: 1x "Expand HF Puffer" (Roche), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 1 x "Step-Out-Mix" (40 nM "Heel-Carrier" 5`-GTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3` und 200 nM "Heel-PCR" 5`-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3`), 200 nM TCRAC-spezifischem Primer 5`-GACCACAGCCGCAGCGTCATGAG-3` oder TCRBC-spezifischem Primer 5`-TGGGTGACGGGTTTGGCCCTATC-3`, 5  $\mu$ l cDNA sowie 1,4 U des "Expand HF Polymerase Mixes". Das "Touchdown"-Programm der "Step-Out-PCR" bestand aus einem ersten Zyklus

mit 94°C für 60 s, einer Pause auf 80°C, während der das Enzym zugegeben wurde, und 72°C für 90 s, gefolgt von 4 Zyklen mit 94°C für 30 s und 72°C für 90 s, 5 Zyklen mit 94°C für 30 s, 70°C für 30 s und 72°C für 90 s, 35 Zyklen mit 94°C für 30 s, 68°C für 30 s und 72°C für 90 s sowie einer einmaligen Inkubation bei 72°C für 5 min.

Für die zweite Runde der Amplifikation wurde 1 µl des Erstrundenprodukts zu 1 x "Thermophilic DNA Polymerase Buffer" (Promega), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 150 nM des Oligos "Heel-PCR" und 150 nM des TCRAC-spezifischen Primers 5'-GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCAGGGT-3' oder des TCRBC-spezifischen Primers 5'-AACACAGCGACCTCGGGTGGG AAC-3' und 2 U "Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A" (Promega) gegeben und unter den gleichen Bedingungen wie in der ersten Runde amplifiziert.

Zur 5'-RACE von mikromanipulierten Zellen sowie von Positivkontrollen (10 sortierte T-Zellen; s. Legende der Tabelle VII) wurde das oben beschriebene Protokoll weiterentwickelt und es wurden die folgenden Modifikationen eingeführt: Um die Länge der amplifizierten Produkte zu verkürzen, wurden TCRAC- bzw. TCRBC-spezifische Oligos eingesetzt, die möglichst nahe am 5'-Ende der C-Segmente binden. Die AC- bzw. BC-spezifischen Oligos der RT wurden durch 5'-GCAGACAGACTTGTCACTGG-3' bzw. 5'-CTTTTGGGTGTGGGAGAT-3', die der ersten Runde durch 5'-GAGTCTCTCAGCTGGTACACGGCAGGGT-3' bzw. 5'-TTTTGGGTGTGGGAGATCTCTGCTTCTG-3' und das AC-spezifische Oligo der zweiten Runde durch 5'-GGTACACGGCAGGGTCAGGGTTC-3' ersetzt. Das Oligo "Heel-Carrier" wurde zu 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGT GGTATCAACGCAGAGT-3' modifiziert und es kamen die folgenden Zweitrundenbedingungen zur Anwendung: 1 µl des Erstrundenprodukts wurde zu 20 mM TRIS-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM je dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 150 nM je Primer sowie 1,25 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies) gegeben. Die Reaktion fand in 96-Napf-Platten statt, begann mit einem Zyklus mit 95°C für 3 min, 68°C für 30 s, 72°C für 90 s gefolgt von 44 Zyklen mit 95°C für 1 min, 68°C für 30 s und 72°C für 90 s und wurde mit einer einmaligen Inkubation bei 72°C für 5 min beendet.

PCR-Produkte ausgewählter Proben (s. Abschnitt 3.3.) der Länge 200-750 Bp wurden direkt sequenziert (s. Abschnitt 2.5.).

### 3 ERGEBNISSE

Das bearbeitete Projekt gliedert sich in drei Teile. Im ersten wurden die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire des T-Zellinfiltrats von Hirnläsionen zweier MS-Fälle auf dem Niveau einzelner Zellen bestimmt. Der zweite und dritte Teil hatte die Aufklärung der Antigenpezifitäten ausgewählter, in situ identifizierter klonal expandierter T-Lymphozyten zum Ziel. Dabei wurde im zweiten Teil versucht, T-Zellklone aus MS-Fall 2 auch in peripherem Blut des Patienten zu detektieren sowie die beiden bei dieser Analyse erhaltenen T-Zellklone zum Zweck der Isolierung zu kultivieren. Der dritte Teil behandelt den Versuch der Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einzelnen mikromanipulierten Zellen. So sollten für T-Zellklone, welche im ersten Teil der Untersuchung anhand ihrer TCR $\beta$ -Genumlagerungen als besonders stark expandiert erkannt worden waren, die zugehörigen TCR $\alpha$ -V-Regionsequenzen identifiziert werden.

In zukünftigen Experimenten sollen verifizierte Paare von klonalen TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kettensequenzen in Expressionsvektoren kloniert und in einer T-Zelllinie ausgeprägt werden, um in vitro den Liganden für den Rezeptor zu finden (s. Abschnitt 4.4.).

#### 3.1. Die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire des T-Zellinfiltrats von Hirnläsionen zweier MS-Fälle

##### 3.1.1. Auswahl des Hirnmaterials

Bei der Auswahl des Hirnmaterials wurde mit besonderer Sorgfalt vorgegangen. Einerseits war eine spezielle Qualität des Gewebes Voraussetzung. Die chromosomale DNA der einzelnen Zellen mußte weitgehend undegradiert vorliegen, damit die Amplifikation einer einzigen Kopie eines TCR-Allels möglich wurde. Der Erhalt mindestens eines spezifischen Produkts nach Einzelzell-PCR von mikromanipulierten Zellen sollte aus methodischen Gründen (s. Abschnitt 4.1.2.) in mehr als 25% der analysierten Zellen möglich sein (Küppers et al., 1993; Roers et al., 1998). Wegen der weitaus besseren DNA-Qualität, die Gefrier- im Gegensatz zu Paraffinmaterial üblicherweise aufweist, war es also nötig, sich auf Gefriergewebe zu beschränken (Küppers, 1995).

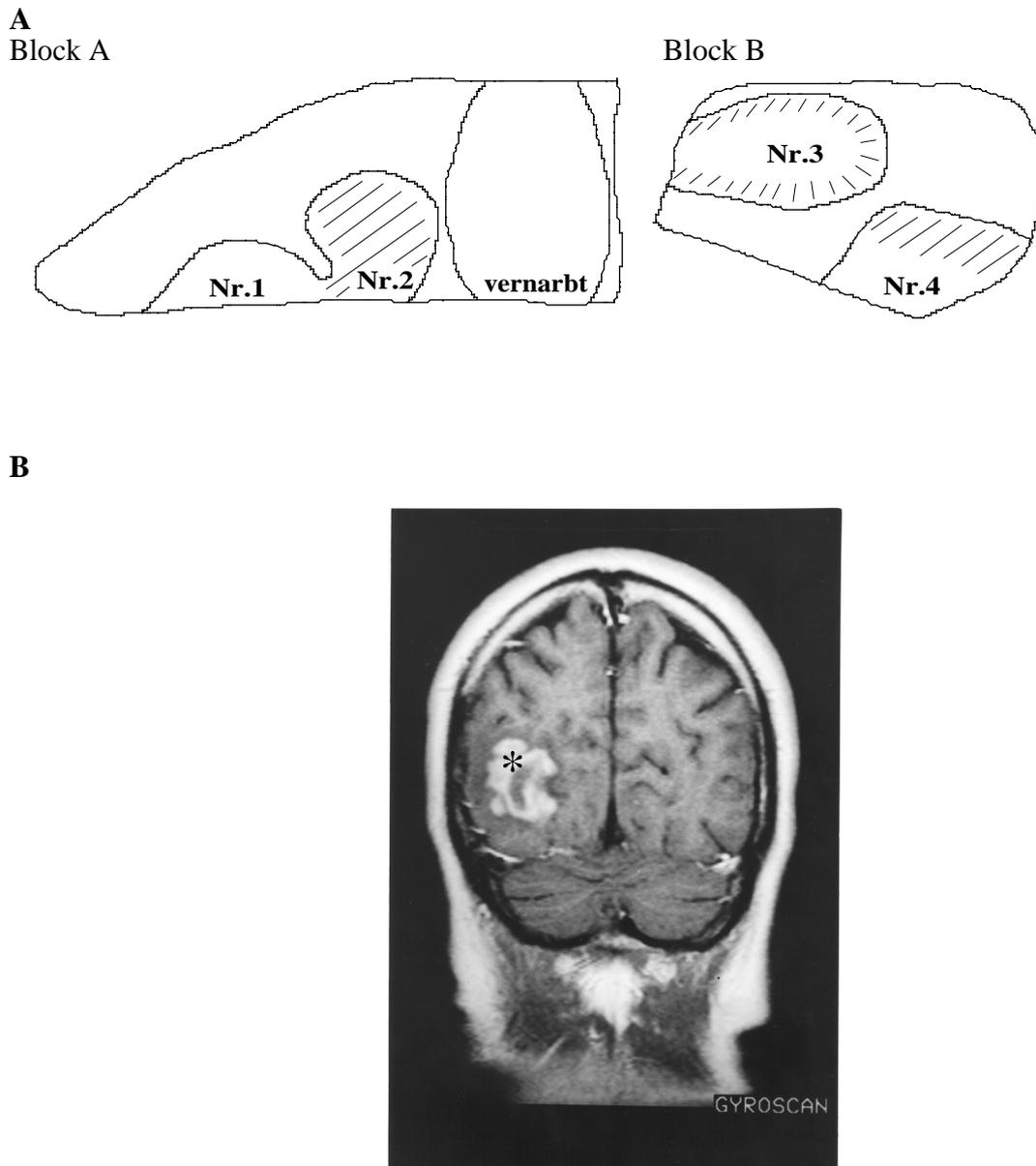
Andererseits war die eindeutige Identifizierung von aktiv demyelinisierenden MS-Läsionen und deren Abgrenzung zu weniger aktiven Läsionen entscheidend. Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. H. Lassmann, Institut für Hirnforschung, Wien, wurde nach Gewebeproben gesucht, die Areale mit aktiver Demyelinisierung und dichte T-Zellinfiltrate aufwiesen. Kriterien für die Aktivität des Entmarkungsprozesses waren dabei die molekulare Zusammensetzung der Myelinabbauprodukte in Makrophagen (z.B. MOG-Abbauprodukte, s. Abb. 2; [Brück et al., 1994; Ozawa et al., 1994]) und die

Expression des Aktivierungsmarkers 27E10 durch Makrophagen (Brück et al., 1995; Lucchinetti et al., 1996). Im weiteren werden Läsionen als “aktiv” oder “aktiv demyelinisierend” bezeichnet, wenn Anzeichen frischen Myelinabbaus sowie frischer Aktivierung von Makrophagen detektierbar waren. Unabhängig von der Anwesenheit eines entzündlichen Infiltrats wurden alle anderen Läsionen hingegen als “inaktiv” angesehen (s. Abschnitt 2.2., Abb. 2).

Proben von zwei Patienten mit insgesamt fünf Läsionen entsprachen den oben genannten Kriterien und wurden für die weitere Analyse eingesetzt. Vier Läsionen stammten aus Autopsiematerial von Fall 1, wovon eine Läsion über ihren gesamten Bereich aktiv, eine weitere hingegen völlig inaktiv war, während zwei andere jeweils aktive als auch inaktive Bereiche enthielten (Abb. 1A, Läsionen Nr. 2, 1, 3 und 4). Eine einzige, vollkommen aktive Läsion wurde im Biopsiematerial von Fall 2 gefunden (Abb. 1B). Bei dieser handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein sehr frühes Stadium der Läsionsentwicklung, da das erkrankte Hirnmaterial bereits zwei Wochen nach klinischer Manifestation der Krankheit entfernt wurde. Sämtliche Läsionen enthielten große Zahlen von T-Zellen, welche entweder in sogenannten perivaskulären Aggregaten (im weiteren “perivaskuläre Zellen” genannt) oder außerhalb von diesen, als einzelne Zellen über das demyelinisierte Parenchym verteilt (“parenchymale Zellen”), vorkamen. Im Parenchym der Läsionen beider Fälle waren mindestens dreimal mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden (s. Legenden der Tabellen III und IV).

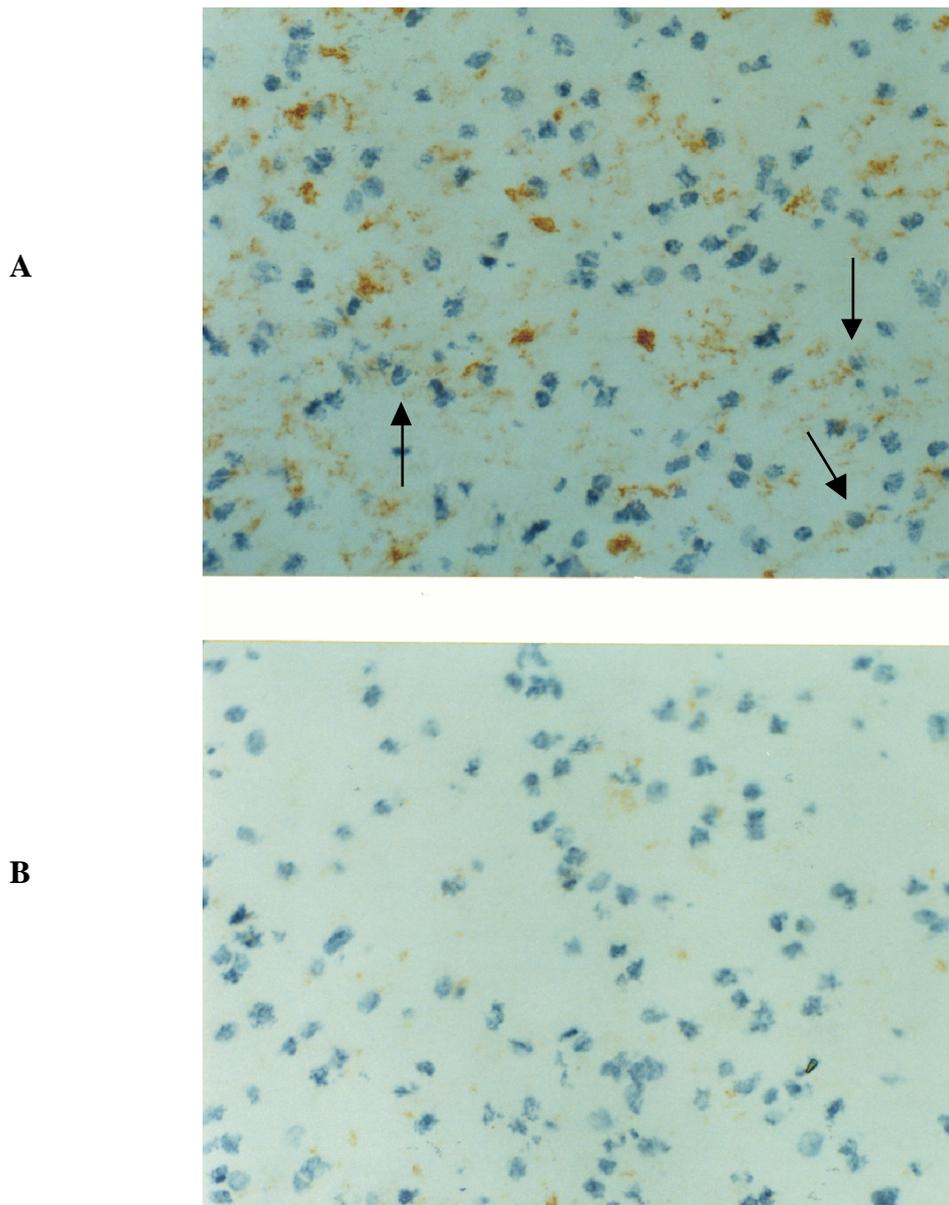
### ***3.1.2. Mikromanipulation von einzelnen T-Zellen aus Gefrierschnitten von MS-Läsionen und Amplifikation ihrer TCR $\beta$ -Genumlagerungen***

Zur Analyse der klonalen Zusammensetzung und des TCR-Repertoires von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus aktiven und inaktiven Hirnläsionen wurden Gefrierschnitte für CD8, CD4 oder CD3 immungefärbt. Einzelne parenchymale CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> und eine geringe Zahl an parenchymalen CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden mikromanipuliert und jeweils einzeln in PCR-Gefäße überführt (Abb. 3). Innerhalb der perivaskulären Infiltrate war wegen der dichten Zellaggregate eine verlässliche Identifizierung von CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> Zellen und deren Abgrenzung von ungefärbten Zellen schwierig; zudem war die Mikromanipulation einzelner Zellen wegen des rigiden Bindegewebes nahezu unmöglich. Daher wurden aus den perivaskulären Infiltraten statt einzelner CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> Zellen jeweils (T-Zell-reiche) Proben von fünf bis 10 Zellen mikromanipuliert und in ein PCR-Gefäß transferiert (Abb. 3).



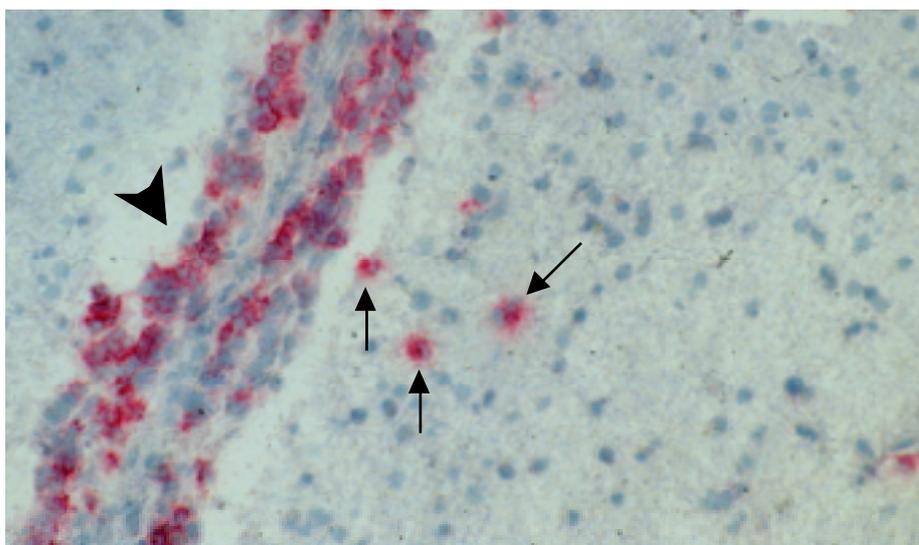
**Abb. 1. Das Hirnmaterial.**

(A) Schematische Übersicht von repräsentativen Schnitten der beiden für Fall 1 untersuchten Gewebelöcher. Die Nummern 1-4 bezeichnen MS-Läsionen, aus welchen T-Zellen mikromanipuliert wurden. Bereiche, die Zeichen aktiven Myelinabbaus zeigten, sind schraffiert dargestellt. Block A enthielt zudem eine alte Läsion ("vernarbt") mit nur geringfügigen T-Zellinfiltraten oder anderen Zeichen von Entzündung, dafür aber mit (Astrozyten-vermittelter) Narbenbildung. (B) Fall 2: Die kernspintomographische Aufnahme des Schädels, aufgenommen zwei Wochen vor der Hirnbiopsie in der Abteilung für Neurologie der Universitätsklinik Bonn (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Schmidt), zeigt rechtsseitig eine einzelne subkortikale Läsion (Sternchen) in der temporookzipitalen weißen Substanz mit perifokalem Ödem. Histologisch waren über den gesamten Bereich der Läsion hinweg Zeichen von fortschreitendem Myelinabbau nachweisbar.



**Abb. 2. Bestimmung der demyelinisierenden Aktivität in den untersuchten Läsionen der Fälle 1 und 2.**

Die Bestimmung des Aktivitätszustands der analysierten Läsionen erfolgte immunhistologisch durch Färbung mit anti-MOG, anti-PLP und anti-27E10 Antikörpern und wurde von Prof. Dr. H. Lassmann, Institut für Hirnforschung, Wien, durchgeführt. Der Nachweis von MOG und PLP in endozytären Vesikeln von Makrophagen und des Aktivierungsmarkers 27E10 auf der Makrophagenoberfläche bedeutet, daß der Beginn der entzündlich-demyelinisierenden Prozesse im untersuchten Bereich nicht länger als 10 Tage zurückliegt. Solche Gewebsregionen wurden als "aktiv demyelinisierend" eingestuft (Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung für beide MS-Fälle s. Abb. 1). Die Abbildungen zeigen anti-MOG gefärbte Schnitte von Fall 1 (MOG bzw. MOG-Abbauprodukte erscheinen braun), die Kerne sind mit Hämatoxylin gegengefärbt (200fache Vergrößerung). **(A)** zeigt einen Ausschnitt aus einer aktiven Läsion. Es sind reichlich Makrophagen mit intrazellulären MOG-Abbauprodukten zu finden (Pfeile). **(B)** zeigt einen Ausschnitt aus einem inaktiven Entmarkungsherd. Makrophagen mit endozytären MOG-Abbauprodukten fehlen. Der Nachweis von Makrophagen erfolgte mittels morphologischer Kriterien sowie anti-27E10- und ORO-Färbung (nicht gezeigt).

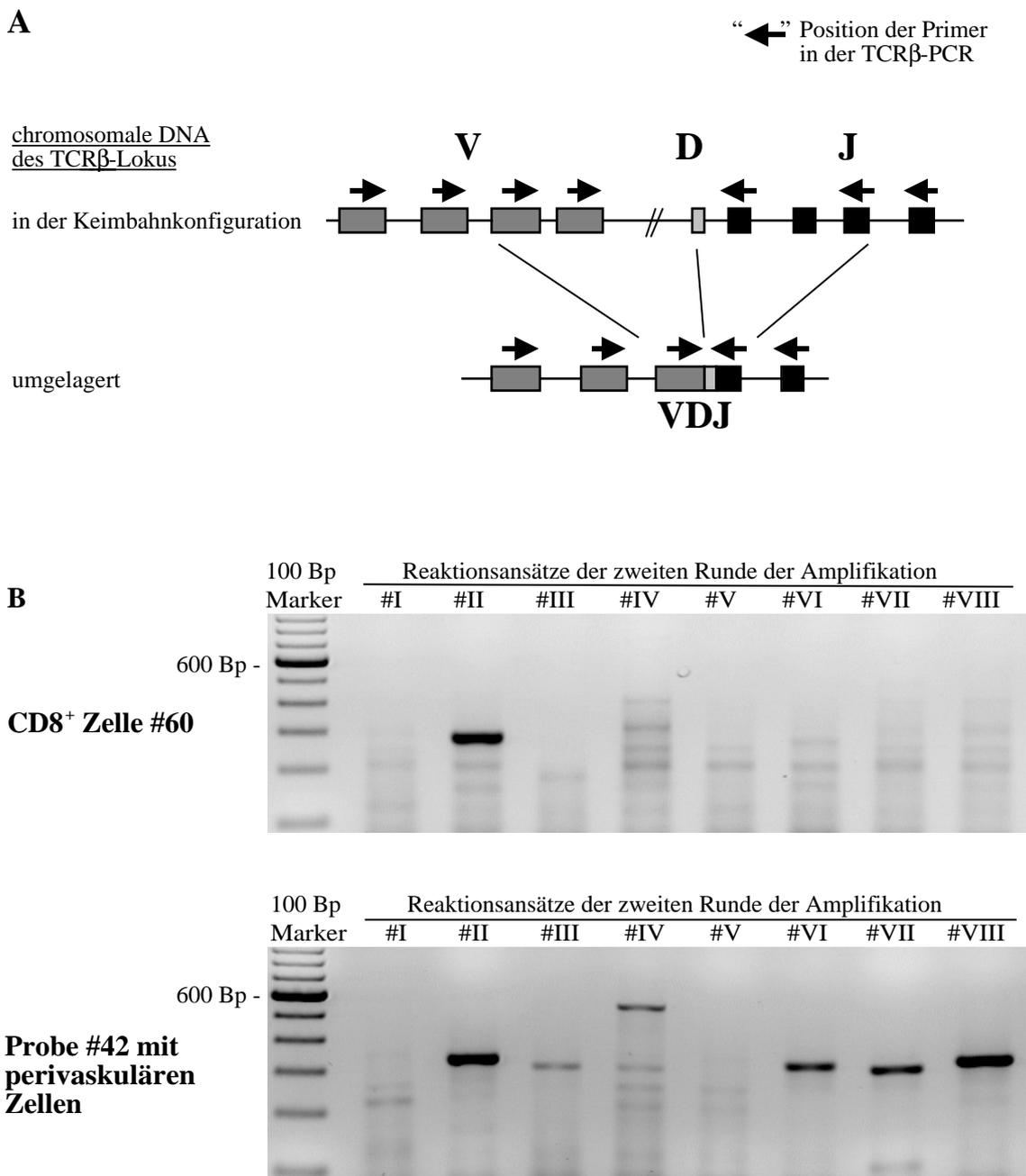


**Abb. 3. Mikromanipulation von T-Zellen aus Gefrierschnitten von MS-Läsionen: Infiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen in parenchymalen und perivaskulären Bereichen.**

Der abgebildete Gewebsschnitt (Läsion 1, Fall 1) wurde mit einem anti-CD8-Antikörper gefärbt (positive Zellen erscheinen rot) und die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt. Während solitär im Parenchym vorkommende T-Zellen (Pfeile) einzeln isoliert wurden, wurden aus den dichten Infiltraten der perivaskulären Bereiche (Pfeilspitze) Gruppen von fünf bis 10 Zellen mikromanipuliert und mittels TCR $\beta$ -PCR analysiert (200fache Vergrößerung).

TCR $\beta$ -Genumlagerungen einzelner parenchymaler Zellen oder kleiner Gruppen von perivaskulären Zellen wurden mit Hilfe einer Mischung von 24 TCRBV-Familien-spezifischen und 8 TCRBJ-spezifischen Primern in der ersten von zwei PCR-Runden auf genomischer DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden direkt sequenziert. Das Prinzip der Umordnung der TCR $\beta$ -Gensegmente im Rahmen der somatischen Rekombination ist in Abb. 4A dargestellt und die Vorgehensweise bei der TCR $\beta$ -Einzelzell-PCR wird in Abb. 4B am Beispiel einer mikromanipulierten Einzelzelle bzw. einer Probe von perivaskulären Zellen erläutert. Zur Kontrolle auf Kontamination durch PCR-Produkte oder Zellen wurden folgende Proben parallel analysiert: einzelne Astrozyten aus benachbarten Schnitten, welche für den Astrozyten-Marker GFAP gefärbt worden waren, Aliquots des die Schnitte während der Mikromanipulations-Prozedur bedeckenden Puffers ("Puffer-Kontrollen") und Wasser-Kontrollen (Tabelle II).

Während 229 von 798 solitären parenchymalen Zellen (29%) und 86 von 140 Proben perivaskulärer Zellen (61%) für mindestens ein spezifisches PCR-Produkt positiv waren, lieferte keine einzige der Negativkontrollen eine TCR-Genumlagerung (Tabelle II). Um die Effizienz der Amplifikation einer einzigen Kopie der TCR $\beta$ -Genumlagerung einer Zelle zu kontrollieren, wurden einzelne (mittels FACS sortierte) TCR $\alpha/\beta^+$ CD3<sup>+</sup> T-Zellen von gesunden Spendern parallel analysiert. 66 von 90 dieser Positivkontrollen lieferten ein spezifisches Produkt (73%; Tabelle II). Die Resultate der Kontrollexperimente stimmen mit früheren Erfahrungen mit dieser Technik überein und sprechen für die Verlässlichkeit des gewählten Ansatzes (s. Abschnitt 4.1.2.).



**Abb. 4. Die Umordnung der TCRβ-Gensegmente und die Amplifikation von TCRβ-Genumlagerungen aus Einzelzellen auf chromosomaler DNA (“single target amplification”).**

(A) Für die β-Kette des TCRαβ-Heterodimers ist die V-Region in drei Gensegmenten kodiert (BV, BD und BJ). Die einzelnen Gensegmente liegen in der Keimbahn-DNA voneinander entfernt und je ein BV-, BD- und BJ-Segment werden während der T-Zellentwicklung durch somatische Rekombination zusammengelagert. Das entstandene VDJ-Exon wird nach der Transkription an ein BC-Segment gespleißt und zum TCRβ-Kettenprotein translatiert (nicht gezeigt). Die Positionen der für die Amplifikation der TCRβ-Umlagerungen verwendeten Primer sind schematisch angegeben. Es wurden 24 TCRBV-Familien-spezifische Oligonukleotide als 5'-gelegene und acht TCRBJ-spezifische Oligonukleotide als 3'-gelegene Primer eingesetzt. Diese Primerkombination erlaubt die Amplifikation der

meisten TCR $\beta$ -Genumlagerungen (Roers et al., 1998); von chromosomaler DNA der Keimbahnkonfiguration wird aufgrund der weit voneinander entfernt liegenden Primerbindestellen kein PCR-Produkt amplifiziert. Die BJ-Primer, welche für die BJ-Segmente 1S2, 1S3, 1S5, 1S6, 2S2, 2S3, 2S6 und 2S7 spezifisch sind, erlauben auch die Amplifikation von Umlagerungen der anderen fünf BJ-Segmente (erwartete Längen der PCR-Produkte je nach umgelagerter VJ-Kombination: 250-650 Bp).

**(B)** Zur Amplifikation der TCRBV-BJ-Umlagerungen wurden mikromanipulierte T-Zellen nach Verdau mit Proteinase K einer ersten Runde der Amplifikation unterzogen. Es wurden alle 32 Primer in einem Reaktionsansatz eingesetzt. Die zweite Runde der Amplifikation wurde mit Aliquots des Erstrundenprodukts in acht separaten Reaktionsansätzen durchgeführt, diesmal unter Verwendung von nur zwei bzw. drei der TCRBV-spezifischen Primer je Ansatz und einer im Vergleich zur ersten Runde "genesteten" TCRBJ-spezifischen Primermischung. Gezeigt sind die PCR-Produkte der zweiten PCR-Runde nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid für eine Einzelzelle (CD8<sup>+</sup> Zelle #60, mikromanipuliert aus Läsion 1, Fall 1; oben) und einer fünf bis 10 Zellen enthaltenden Probe von perivaskulären Zellen (Probe #42, mikromanipuliert aus Läsion 1, Fall 1; unten). Mit #I bis #VIII sind die acht Reaktionsansätze bezeichnet; sie enthielten die folgenden TCRBV-spezifischen Oligonukleotide; #I: BV2, 3 und 22; #II: BV4, 6.1 und 14; #III: BV6.2, 8 und 21; #IV: BV1/5, 11 und 12; #V: BV13 und 15; #VI: BV17, 20 und 9/7/18; #VII: BV23 und 24; #VIII: BV10, 16 und 19.

Die zweite PCR-Runde wurde für die positiven Ansätze wiederholt, diesmal mit den einzelnen BV-spezifischen Primern (und der BJ-Primermischung) in separaten Reaktionsansätzen. Die PCR-Produkte der hier positiven Ansätze wurden aufgereinigt und unter Verwendung des entsprechenden BV-Primers direkt sequenziert. Bei Zelle #60 handelte es sich um einen Vertreter von CD8<sup>+</sup> Klon 1 (Ansatz #II [Bande bei 280 Bp]; Umlagerung BV6S5-BJ1S2, amplifizierbar mit den Primern BV6.1 und BJ1.2). Aus der Probe #42 wurden vier Umlagerungen erhalten, und zwar ein Vertreter von Klon 13 (#IV [ $\approx$  550 Bp]; BV5S2-BJ2S4, Primer BV1/5 und BJ2.6), zwei weitere potentiell funktionelle Umlagerungen (#II [ $\approx$  320 Bp]; BV14S1-BJ1S2, Primer BV14 und BJ1.2 bzw. #VII [ $\approx$  300 Bp]; BV24S1-BJ1S2, Primer BV24 und BJ1.2) sowie eine nicht funktionelle Umlagerung (#VIII [ $\approx$  320 Bp]; BV10S1-BJ1S2, Primer BV10 und BJ1.2). In anderen Reaktionsansätzen (z.B. #III und #VI [beide  $\approx$  310 Bp]) wurden ebenfalls Produkte erhalten; diese sind jedoch, wie die Sequenzierung ergab, unspezifischen Kreuzreaktionen zuzuschreiben.

Aus Gewebsschnitten von Fall 1 wurden 547 solitäre parenchymale T-Zellen und 107 Proben von perivaskulären Zellen analysiert, aus denen insgesamt 219 potentiell funktionelle Genumlagerungen amplifiziert werden konnten (als "potentiell funktionell" bezeichnete Genumlagerungen sollten der Zelle - der lesbaren Sequenz nach zu urteilen - als funktionsfähige TCR $\beta$ -Kette im TCR-Heterodimer dienen können). Für Fall 2 wurden aus 251 solitären parenchymalen T-Zellen und 33 Proben von perivaskulären Zellen insgesamt 122 potentiell funktionelle Genumlagerungen erhalten (Tabelle II).

**Tabelle II. Zusammenfassung der Einzelzell-PCR-Analyse von mikromanipulierten T-Zellen aus MS-Läsionen der Fälle 1 und 2.**

analysierte Proben		positiv für $\geq 1$ spezifisches PCR-Produkt	Anzahl potentiell funktioneller TCR $\beta$ - Genumlagerungen
Fall 1	547 einzelne parenchymale T-Zellen	141/547 (26%)	133
	107 Proben perivaskulärer Zellen	60/107 (56%)	86
Fall 2	251 einzelne parenchymale T-Zellen	88/251 (35%)	76
	33 Proben perivaskulärer Zellen	26/33 (79%)	46
Kontrollen	90 mikromanipulierte GFAP <sup>+</sup> Astrozyten	0/90	
	90 Pufferproben	0/90	
	90 Wasserkontrollen	0/90	
	90 einzelne FACS-sortierte T-Zellen	66/90 (73%)	58

Es wurden einzelne parenchymale T-Zellen sowie Proben von 5-10 Zellen aus perivaskulären Infiltraten aus Schnitten von MS-Gefriergewebe mikromanipuliert und daraus TCR $\beta$ -Genumlagerungen amplifiziert. Als Negativkontrollen dienten einzelne Astrozyten, die aus benachbarten Schnitten mikromanipuliert wurden, Aliquots des Puffers, welcher den Schnitt während der Mikromanipulationsprozedur bedeckte, sowie PCR-Ansätze, die PCR-Puffer jedoch keine Zellen enthielten ("Wasserkontrollen"). Die Effizienz der Einzelzell-PCR wurde mittels einzelner, aus dem Blut normaler Spender stammender T-Zellen kontrolliert.

Unter den 448 Genumlagerungen, welche insgesamt von mikromanipulierten und Kontroll-T-Zellen amplifiziert wurden und für die das Leseraster eindeutig zu bestimmen war, waren 49 nicht produktiv (11%), d.h. entweder wurde das korrekte Leseraster im Bereich der CDR3-Region verlassen, die Umlagerung enthielt ein Pseudogen oder sie wies ein Stop-Codon in der CDR3-Region auf. Da sich die vorliegende Studie auf die Analyse von potentiell funktionellen TCR $\beta$ -Genumlagerungen konzentrierte, wurden Banden, die von Einzelzellen zusätzlich zu einer potentiell funktionellen V-Regionsequenz amplifiziert worden waren und bei denen es sich möglicherweise um nicht funktionelle Umlagerungen gehandelt hätte, nicht notwendigerweise sequenziert. Daher kommen nicht funktionelle Genumlagerungen in menschlichen T-Zellen höchstwahrscheinlich häufiger vor als es diese Resultate nahelegen.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß eine erhebliche Anzahl von Umlagerungen aus TCR $\gamma\delta^+$  statt aus TCR $\alpha\beta^+$  T-Zellen erhalten wurde (potentiell funktionelle TCR $\beta$ -Genumlagerungen sind auch in TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen beschrieben worden [Robey und Fowlkes, 1998]) wurden einander benachbarte Schnitte gegen TCR $\gamma\delta$  bzw. TCR $\alpha\beta$  gefärbt. In beiden Fällen machten TCR $\gamma\delta^+$  T-Zellen <3% aller T-Zellen aus.

### ***3.1.3. Die Mehrheit der parenchymalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in aktiven und inaktiven Läsionen beider MS-Fälle setzte sich aus wenigen Klonen zusammen***

In den Tabellen III und IV sind potentiell funktionelle TCR $\beta$ -Genumlagerungen denjenigen Proben zugeordnet, von welchen sie amplifiziert wurden (d.h. entweder parenchymale CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> oder perivaskuläre Zellen).

Von den 81 solitären parenchymalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus den vier verschiedenen Läsionen von Fall 1 mikromanipuliert worden waren und eine potentiell funktionelle

Umlagerung lieferten, kamen 28 nur einmal vor, d.h. ihre TCR $\beta$ -V-Regionsequenz wurde nur aus einer Probe amplifiziert (Tabelle III). Die Mehrheit von 53 Sequenzen jedoch (65%), setzten sich aus 13 Umlagerungen zusammen, die jeweils von mehr als einer Zelle erhalten wurden. Bei jeder dieser 13 Umlagerungen handelte es sich daher um die TCR $\beta$ -V-Region eines expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellklons. Einer dieser Klone (Klon 1) war besonders stark expandiert; seine Umlagerung machte 28 aller 81 parenchymalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus (35%). Die anderen (in der gesamten Analyse identifizierten) CD8<sup>+</sup> T-Zellklone kamen hier ein- bis fünfmal vor (Tabelle III).

Um zu prüfen, ob zwischen aktiven und inaktiven Läsionen hinsichtlich der klonalen Zusammensetzung und des TCR-Repertoires Unterschiede bestehen, wurden zwei Läsionen miteinander verglichen. Läsion 2 zeigte deutliche Anzeichen aktiver Demyelinisierung sowie über den gesamten erkrankten Bereich verteilte ORO<sup>+</sup> Makrophagen, wohingegen die unmittelbar benachbart liegende Läsion 1 vollkommen inaktiv (Abb. 1A) und ORO<sup>-</sup> war (s. Abschnitt 2.2.). Der Vergleich mußte auf die Population der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschränkt werden, da sich in beiden Läsionen zwar eine große Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen befand, CD4<sup>+</sup> T-Zellen jedoch kaum zu finden waren. Es zeigte sich, daß der stark expandierte Klon 1 in der inaktiven Läsion 1 etwa zweimal häufiger vertreten war. Ansonsten fanden sich keine auffälligen Unterschiede, d.h. die größten CD8<sup>+</sup> Klone (Klone 1, 2 und 9) waren sowohl in Läsion 1 als auch in Läsion 2 vertreten (Tabelle III, und s. u.). Weitere 15 Umlagerungen wurden aus Läsion 1 von CD3<sup>+</sup> Zellen erhalten. Die Mehrheit konnte auch hier expandierten Klonen zugeordnet werden (10/15 [67%]). Unter den CD3<sup>+</sup> Zellen waren ausschließlich Mitglieder von CD8<sup>+</sup> Klonen zu finden (Klon 1, 6/15 [40%]; Klon 2, 3/15; Klon 19, 1/15).

Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Läsionen 3 und 4, die beide sowohl aktive als auch inaktive Bereiche aufwiesen (Abb. 1A), waren im Vergleich zu den Läsionen 1 und 2 ähnlich zusammengesetzt. Klon 1 kam in allen vier Läsionen am häufigsten vor und Mitglieder der meisten anderen Klone waren in mindestens zwei Läsionen zu finden.

Von den 24 solitären parenchymalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der (einzigen) Läsion von Fall 2 gehörte mit 17 (71%) die überwiegende Mehrheit neun verschiedenen Klonen an, während 7 Sequenzen nur einmal erhalten wurden (Tabelle IV). Allerdings fehlte hier im Vergleich zum Fall 1 ein gleichermaßen dominanter Klon; Klon 2 als der größte kam viermal vor (17%; Tabelle IV).

**Tabelle III. Verteilung der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellklone im Parenchym und in den perivaskulären Aggregaten der vier für Fall 1 analysierten Läsionen.**

Läsion	einzelne parenchymale CD8 <sup>+</sup> T-Zellen		einzelne parenchymale CD4 <sup>+</sup> T-Zellen		Proben von perivaskulären Zellen	
	Klon #	Häufigkeit	Klon #	Häufigkeit	Klon #	Häufigkeit
<b>Nr. 1</b>	1	14/29 (48%)			1	8/41 (20%)
	9	3/29			6	2/41
	3, 4, 7,				3, 4,	
	15, 21	1/29	12	1/3	13, 17	1/41
	$\Sigma$	22/29 (76%)			$\Sigma$	14/41 (34%)
<b>Nr. 2</b>	1	6/28 (21%)			1, 8	3/25
	2	3/28			2	2/25
	9	2/28			7, 10,	
	3, 16,		11	1/2	16, 21	1/25
	18, 19	1/28			$\Sigma$	12/25 (48%)
$\Sigma$	15/28 (54%)					
<b>Nr. 3</b>	1	8/24 (33%)			1	4/14
	16, 18	2/24			4	2/14
	4, 14,		10, 11	2/19	9, 14	1/14
	15, 17	1/24	12, 13	1/19	$\Sigma$	8/14
	$\Sigma$	16/24 (67%)	$\Sigma$	6/19 (32%)		
<b>Nr. 4</b>					1	3/6
			10	1/13	9, 15	1/6
					$\Sigma$	5/6
<b><math>\Sigma</math></b>	1	28/81 (35%)			1	18/86 (21%)
	9	5/81			4, 8	3/86
	2, 16, 18	3/81			2, 6, 9	2/86
	3, 4, 15	2/81	10, 11	3/37	3, 7, 10,	
	7, 14, 17,		12	2/37	13, 14, 15,	
	19, 21	1/81	13	1/37	16, 17, 21	1/86
	$\Sigma$	53/81 (65%)	$\Sigma$	9/37 (24%)	$\Sigma$	39/86 (45%)

Eine TCR $\beta$ -Genuklonierung wurde einem expandierten T-Zellklon zugeordnet, wenn dieselbe TCR $\beta$ -V-Regionsequenz aus zwei verschiedenen Proben von Zellen, die aus Hirnmaterial von Fall 1 mikro-manipuliert worden waren, amplifiziert worden war. Die Klone sind willkürlich nummeriert. Es sind nur potentiell funktionelle TCR $\beta$ -Genuklonierungen dargestellt. Außer den Klonen 6 und 8 konnten alle Klone entweder der Population der CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen zugeordnet werden, da die klonale Umlagerung zumindest einmal aus einer einzelnen parenchymalen CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> Zelle amplifiziert worden war. Sieben der 24 insgesamt erhaltenen nicht funktionellen Umlagerungen verteilten sich auf drei Klone. Sie konnten keinen durch potentiell funktionelle Umlagerungen definierten Klonen zugeordnet werden.

Die Population der parenchymalen T-Zellen wurde von CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominiert (CD8/CD4  $\approx$  3; ermittelt in den Läsionen 3 und 4). Ebenso waren die perivaskulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den perivaskulären CD4<sup>+</sup> T-Zellen - grob geschätzt - dreimal so häufig.

**Tabelle IV. Verteilung der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellklone im Parenchym und in den perivaskulären Aggregaten der einen für Fall 2 analysierten Läsion.**

einzelne parenchymale CD8 <sup>+</sup> T-Zellen		einzelne parenchymale CD4 <sup>+</sup> T-Zellen		Proben von perivaskulären Zellen	
Klon #	Häufigkeit	Klon #	Häufigkeit	Klon #	Häufigkeit
2	4/24 (17%)				
5	3/24			8	3/46 (7%)
3, 6, 9	2/24			1, 2, 7	2/46
4, 8, 7, 10	1/24	13, 14, 15	2/52	3, 4, 10	1/46
$\Sigma$	17/24 (71%)	$\Sigma$	6/52 (12%)	$\Sigma$	12/46 (26%)

Eine TCR $\beta$ -Genuklagerung wurde einem expandierten T-Zellklon zugeordnet, wenn dieselbe TCR $\beta$ -V-Regionsequenz aus zwei verschiedenen Proben von Zellen, die aus Hirnmaterial von Fall 2 mikro-manipuliert worden waren, amplifiziert worden war. Die Klone sind willkürlich nummeriert. Es sind nur potentiell funktionelle TCR $\beta$ -Genuklagerungen dargestellt. Außer Klon 1 konnten alle Klone entweder der Population der CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen zugeordnet werden, da die klonale Umlagerung zumindest einmal von einer einzelnen parenchymalen CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> Zelle amplifiziert worden war. Zwei der 17 insgesamt erhaltenen nicht funktionellen Umlagerungen bildeten einen Klon. Dieser konnte keinem der durch potentiell funktionelle Umlagerungen definierten Klone zugeordnet werden.

Die Population der parenchymalen T-Zellen wurde von CD8<sup>+</sup> T-Zellen dominiert (CD8/CD4 = 5-6). Ebenso waren die perivaskulären CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den perivaskulären CD4<sup>+</sup> T-Zellen - grob geschätzt - dreimal so häufig.

#### **3.1.4. Die klonale Zusammensetzung der parenchymalen CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation war heterogener als die der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation**

28 der 37 TCR $\beta$ -Genuklagerungen, welche von parenchymalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Fall 1 amplifiziert wurden, kamen nur einmal vor, wohingegen vier Umlagerungen mehrfach erhalten wurden. Neun der 37 Zellen verteilten sich auf diese vier Klone (24%; Tabelle III).

In Fall 2 konnte ebenso mit 46 der 52 CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Mehrheit keinem expandierten T-Zellklon zugeordnet werden, sechs T-Zellen (12%) gehörten hingegen zu insgesamt drei Klonen (Tabelle IV).

Also zeichnete sich die Population der parenchymalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Fällen durch deutlich größere Diversität aus.

### ***3.1.5. Klonal expandierte T-Zellen waren im Parenchym im Vergleich zu den perivaskulären Bereichen häufiger***

45% der 86 potentiell funktionellen TCR $\beta$ -Genumlagerungen, welche aus Proben von perivaskulären Zellen von Fall 1 erhalten wurden, konnten expandierten T-Zellklonen zugeordnet werden (Tabelle III). Die größten Klone (> drei Mitglieder amplifiziert) waren sowohl in den perivaskulären Bereichen als auch im Parenchym vorhanden.

Von den 46 Sequenzen, die von perivaskulären Zellen des Falls 2 stammten, konnte ebenfalls nur eine Minderheit (26%) klonal expandierten T-Zellen zugeordnet werden. Mit Ausnahme des Klons 5, waren auch hier die größeren Klone (> 2 Mitglieder detektiert) in perivaskulären wie parenchymalen Bereichen zu finden (Tabelle IV).

Da es sich in beiden Fällen bei dem weitaus größten Teil der parenchymalen T-Zellen um CD8<sup>+</sup> T-Zellen handelte (CD8/CD4  $\approx$  3-6; s. Legenden der Tabellen III und IV), waren in beiden Fällen jeweils eine Mehrheit der parenchymalen T-Zellen im Vergleich zu den perivaskulären T-Zellen klonal expandiert.

### ***3.1.6. Die TCR $\beta$ -V-Regionsequenzen einiger CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten Hinweise für Selektion für gemeinsame Peptidspezifitäten***

Um bereits ohne Wissen um die Peptidspezifitäten expandierter T-Zellklone Hinweise auf ihre mögliche pathogenetische Relevanz zu erhalten, wurde unter den V-Regionsequenzen, die von mikromanipulierten T-Zellen beider MS-Fälle erhalten worden waren, nach Anzeichen für eine mögliche Selektion der TCR auf gemeinsame Antigen-spezifitäten gesucht. Zum einen wurden die (von den DNA-Sequenzen abgeleiteten) Aminosäuresequenzen aller potentiell funktionellen TCR $\beta$ -Genumlagerungen hinsichtlich möglicher Ähnlichkeiten miteinander verglichen, zum anderen wurde geprüft, ob bestimmte BV- oder BJ-Segmente häufiger als in einer Kontroll-T-Zellpopulationen vorkamen.

Die Analyse der CDR3-Sequenzen von Fall 1 ergab, daß die Aminosäuresequenz der V-Region des CD8<sup>+</sup> Klons 7 völlig identisch zu der von der Umlagerung A278 kodierte war, welche einmal aus einer Probe von perivaskulären Zellen erhalten wurde (Tabelle V). Unter einer moderaten Zahl von Zellen klonal voneinander unabhängige T-Zellen mit einer identischen TCR $\beta$ -Kette zu finden (die unterschiedlichen Nukleotidsequenzen sind in Tabelle V gezeigt) spricht sehr stark für die Annahme, daß diese Zellen an einer Immunantwort gegen dasselbe Epitop beteiligt waren. Darüberhinaus tauchte das NDN-kodierte Aminosäuresequenzmotiv "SGSG" dieser  $\beta$ -Kette ebenso in der einmal erhaltenen Sequenz H518 auf. Die CDR3-Länge war gleich und das "SGSG" befand sich an derselben Position relativ zum konservierten Cystein des BV-Segments (Tabelle V). Die CDR3-Region des stark expandierten Klons 1 war diesen Sequenzen insofern ähnlich, als dessen Aminosäuresequenz an Stelle des "SGSG" "SGQG" lautete (Q [Glutamin] ist wie S [Serin] eine polare und ungeladene

ne Aminosäure). Weitere mehrfach vorhandene CDR3-Aminosäuremotive wurden unter den Sequenzen der anderen CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder der T-Zellen von Fall 2 nicht gefunden.

Der Vergleich der CDR3-Sequenzen von Fall 1 und 2 untereinander ergab jedoch einen auffälligen Befund. Die Aminosäuresequenz der V-Region des CD8<sup>+</sup> Klons 9 von Fall 1 (BV12S2 CA TN**PGDR** NQPQHFG BJ1S5; Tabelle III) war der des CD8<sup>+</sup> Klons 8 von Fall 2 (BV13S3 CASS **PGDRAQ** YNEQFFG BJ2S1; Tabelle IV) insofern ähnlich, als beide das Aminosäuremotiv "PGDR" an derselben Position relativ zum konservierten Cystein aufwiesen und zudem BV-Gensegmente aus nah verwandten BV-Genfamilien verwendeten.

16 der 37 CD4<sup>+</sup> T-Zellen (43%) in Fall 1 verwendeten eine potentiell funktionelle Genumlagerung mit dem BJ-Segment BJ1S1. Es wurde gezeigt, daß nur 9-15% der Umlagerungen von unselektierten T-Zellen gesunder Individuen dieses BJ-Segment inkorporiert hatten (Hall und Lanchbury, 1995; Rosenberg et al., 1992). Zudem enthielt ein Kontrollkollektiv von 196 potentiell funktionellen Genumlagerungen, die von T-Zellen aus dem peripheren Blut fünf gesunder Spender erhalten wurden, nur zu 12% Umlagerungen von BJ1S1 ([Roers et al., 2000; Roers et al., 1998; Willenbrock et al., 2000], diese Untersuchung und Daten nicht gezeigt). Bis auf diesen Befund ähnelte die Verteilung der BV- und BJ-Gensegmente in Fall 1 und 2 der des Kontrollkollektivs bzw. den publizierten Daten.

**Tabelle V. Fall 1: CDR3-Nukleotidsequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen von TCRβ-Genumlagerungen aus mikromanipulierten T-Zellen mit Ähnlichkeiten innerhalb der CDR3-Region.**

Klon/ Probe	BV	V	NDN	J	BJ	CDR3 Länge
A278	11S1	C A S S E	<b>S G S G</b>	E K L F F G	1S4	10
		TGTGCCAGCAGTGAA	TCCGGATCTGGC	GAAAAACTGTTTTTTGGC		
7	11S1	C A S S E	<b>S G S G</b>	E K L F F G	1S4	10
		TGTGCCAGCAGTGAA	AGTGGGTCCGGG	GAAAAACTGTTTTTTGGC		
H518	13S3	C A T G V	<b>S G S G</b> G	E Q F F G	2S1	10
1	6S5	C A S S	L <b>S G Q G</b>	D Y G Y T F G	1S2	11

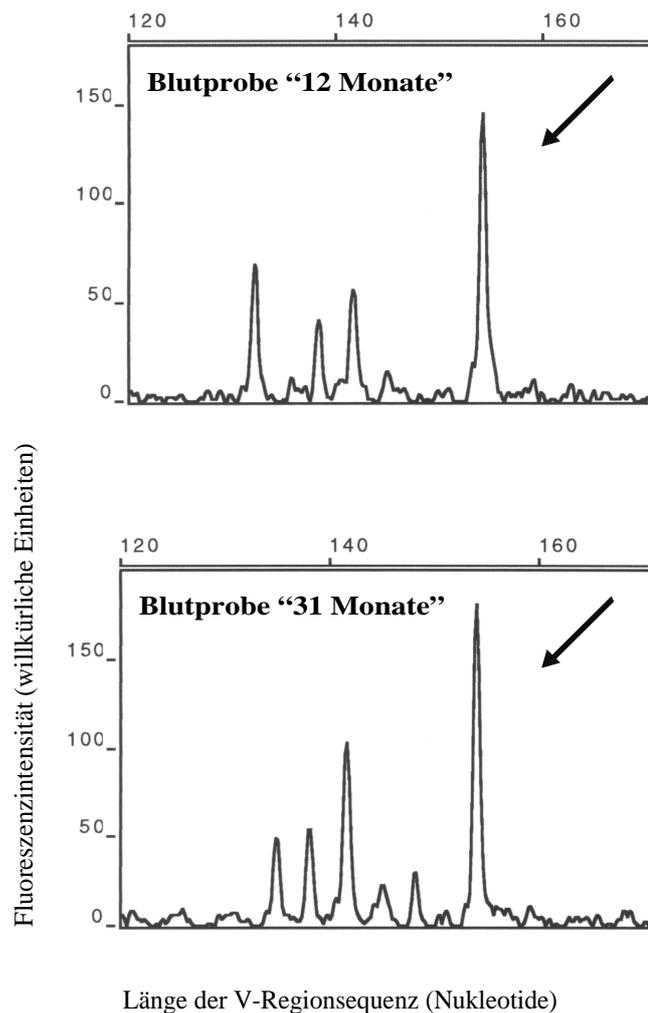
Die CDR3-Sequenzen sind vom konservierten Cystein der TCRBV- bis zum konservierten FG-Motiv der TCRBJ-Segmente dargestellt. Mit "NDN" sind die Aminosäuren der hypervariablen V-J-Übergänge, welche durch N- und P-Nukleotide sowie D-Elemente codiert werden, bezeichnet. Es wurde der CDR3-Längendefinition von Moss und Bell (Moss und Bell, 1995) gefolgt. Die Sequenzen A278 und H518 wurden aus Proben von perivaskulären Zellen amplifiziert (die Klone 1 und 7 werden in Tab. III eingeführt). Aminosäuren des gemeinsamen "SGSG"-Motivs sind fett gedruckt. Bei den Sequenzen "A278" und "Klon 7" handelt es sich um unabhängige TCRβ-Genumlagerungen, da ihre NDN-Regionen an mehreren Stellen der Nukleotidsequenzen differieren. Daß PCR-Fehler für alle diese Unterschiede verantwortlich sind, kann ausgeschlossen werden.

### **3.2. Die Detektion zweier im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter T-Zellklone im peripheren Blut des Patienten und der Versuch ihrer Isolierung.**

Endgültiges Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Aufklärung der Antigenpezifitäten ausgewählter, in den MS-Läsionen identifizierter T-Zellklone. Es standen zwei Blutproben des Patienten 2, welche 12 bzw. 31 Monate nach der Hirnbiopsie gewonnen worden waren, zur Verfügung. Unter Verwendung zweier verschiedener Ansätze wurde versucht zu ermitteln, ob im Hirnmaterial klonal expandierte T-Zellen ebenso unter T-Zellen des peripheren Bluts dieses Patienten in hoher Häufigkeit zu finden, und somit prinzipiell Isolierungs- und Klonierungstechniken zugänglich sind.

#### ***3.2.1. In Fall 2 wurde ein im Hirnmaterial identifizierter CD8<sup>+</sup> Klon mittels "CDR3-Spektratyping" auch im Blut des Patienten detektiert***

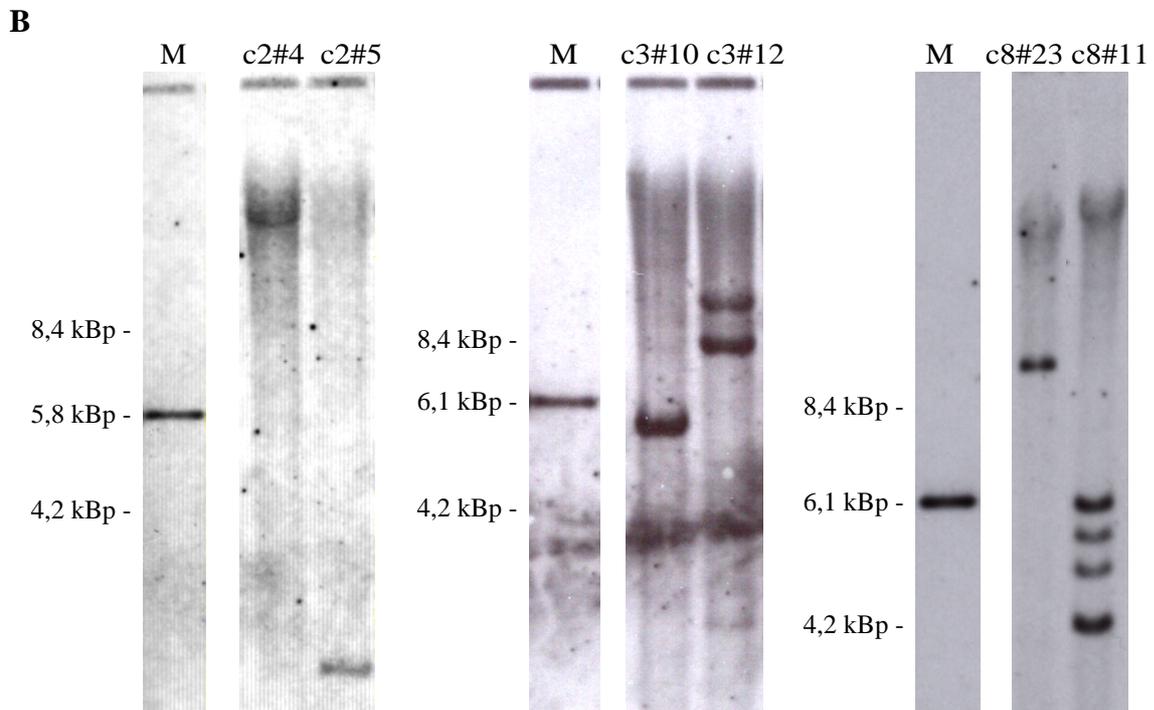
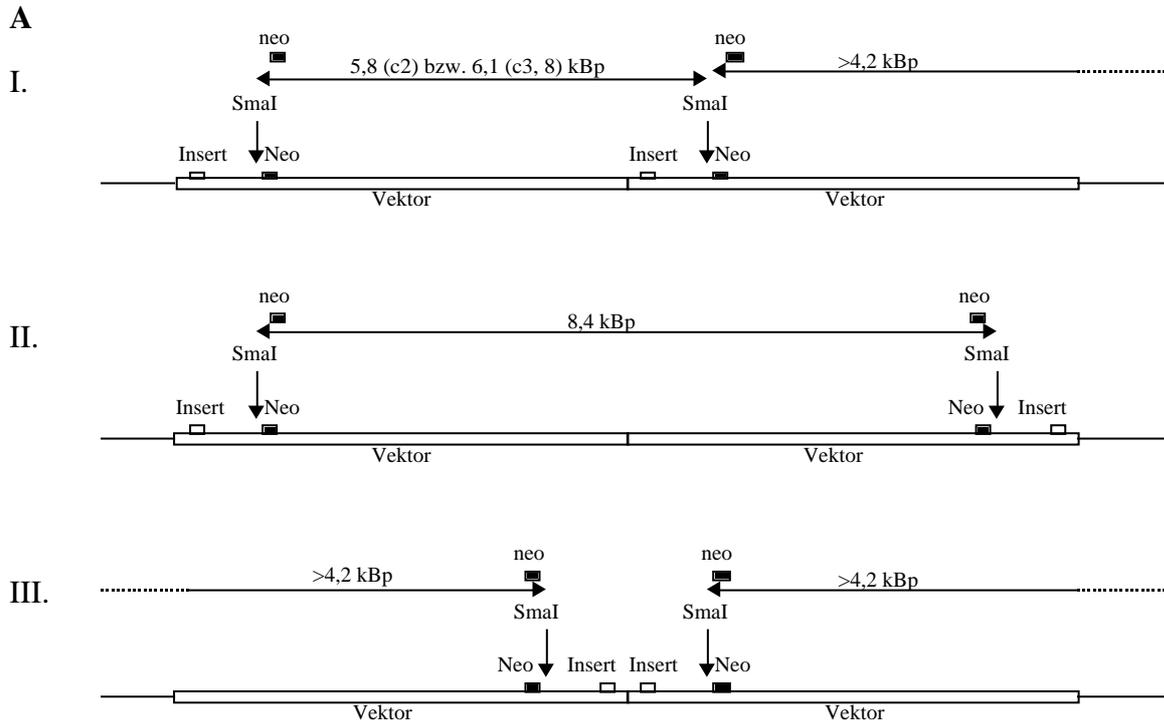
In einem ersten Ansatz wurden sogenannte "CDR3-Spektratyping"-Analysen ("Immuoskope") durchgeführt. Im Menschen kann die CDR3-Länge einer TCR $\beta$ -Kette zwischen sechs und 17 Aminosäuren variieren, im Durchschnitt beträgt sie etwa 10 Aminosäuren (Moss und Bell, 1995). Die auf RT-PCR basierende CDR3-Spektratyping-Technik ermöglicht über die Untersuchung der CDR3-Längenverteilungen in TCR $\beta$ -Transkripten von PBMCs das Auffinden expandierter T-Zellklone. Nach Isolierung der RNA aus den zu testenden Proben werden die TCR $\beta$ -Transkripte revers transkribiert und mit einem TCRBC- und 26 TCRBV-spezifischen Primern in 26 getrennten Ansätzen amplifiziert. Die PCR-Produkte dienen in sogenannten "runoff"-Reaktionen, welche durch fluoreszenzmarkierte TCRBJ-spezifische Oligonukleotide geprimt werden, als Vorlagen. "Runoff"-Produkte werden dann auf einem automatischen Sequenziergerät analysiert. Für jede CDR3-Länge entsteht dabei eine Bande, deren Intensität die Häufigkeit von Transkripten dieser Länge widerspiegelt. Expandierte Klone treten aus dem Muster der allgemeinen CDR3-Längenverteilung, die man für polyklonale T-Zellpopulationen erhält - einem Gaußschen Verteilungsmuster ähnelnd -, als auffällige Peaks hervor (Pannetier et al., 1995). Die Technik ist in der Lage, klonal expandierte T-Zellen in einer polyklonalen T-Zellpopulation mit einer Sensitivität von ungefähr 1 in  $5 \times 10^3$  (abhängig von der klonalen CDR3-Länge und der verwendeten Primerkombination) zu detektieren (Cochet et al., 1992; Goebels et al., 2000).



**Abb. 5. Fall 2: Nachweis von CD8<sup>+</sup> Klon 10 unter T-Zellen des peripheren Bluts mittels "CDR3-Spektrotyping"-Analyse.**

Es wurden mit cDNA, die aus RNA von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen zweier Blutentnahmezeitpunkte synthetisiert worden war, "CDR3-Spektrotyping"-Analysen der TCR $\beta$ -Genumlagerungen durchgeführt. Die Spektragramme der BV14-BJ1S1-Subpopulationen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut, welches 12 (oben) bzw. 31 Monate (unten) nach der Hirnbiopsie gewonnen wurde, sind gezeigt. Bei den auffälligen, durch Pfeile gekennzeichneten Peaks handelte es sich möglicherweise um die TCR $\beta$ -Genumlagerung des Klons 10 (dieselbe V-J-Kombination und CDR3-Länge). Direktes Sequenzieren der BV14-BJ1S1 PCR-Produkte lieferte Mischsequenzen, die jedoch die Anwesenheit der CDR3-Sequenz des Klons 10 möglich erscheinen ließen. Die Produkte wurden in einen Plasmidvektor kloniert, dieser in *Escherichia coli* transformiert, und Plasmid-DNA zufällig ausgewählter Bakterienkolonien sequenziert. Die V-Regionsequenz des Klons 10 wurde in 7 von 26 ("12 mo") bzw. 7 von 12 Kolonien ("31 mo") erhalten.

Direktes Sequenzieren der BV5.1-BJ2S2 PCR-Produkte aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen beider Zeitpunkte lieferte Mischsequenzen, welche die Anwesenheit des CD4<sup>+</sup> Klons 14 (s. Tabelle IV) möglich erscheinen ließen. Es wurde weiter wie oben beschrieben verfahren; die V-Regionsequenz des Klons 14 wurde jedoch in keiner von 26 ("12 mo") bzw. 21 Kolonien ("31 mo") erhalten.



**Abb. 6. Southern-Blot-Analyse von transfizierten Jurkat-Kontrollzellen zum Nachweis der Integration einer einzigen Kopie der klonalen Umlagerungen der T-Zellklone 2, 3 und 8 von Fall 2.**

Genomische DNA verschiedener Klone von Jurkatzellen, welche mit dem Vektor pRc/CMV plus der TCR $\beta$ -Umlagerung der T-Zellklone 2, 3 und 8 (s. Tabelle IV) stabil transfiziert worden waren (s. Abschnitt 2.9.), wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut. SmaI schneidet in eukaryontischer genomischer DNA selten, im Vektor genau einmal und in jeder der drei Umlagerungen überhaupt nicht. Die Blots wurden mit der Probe "neo" hybridisiert. **(A)** zeigt die drei Möglichkeiten einer "Tandem-Mehrfachintegration" mit den verschiedenen Orientierungen des Vektors. "Insert" steht für die jeweilige TCR $\beta$ -Umlagerung, "Neo" für die Neomycinresistenzkassette, SmaI $\downarrow$  für die SmaI-Schnittstelle des Vektors, "<-->" für die zu erwartenden Fragmentgrößen, "—" für chromosomale DNA und c2, c3 bzw. c8 für Klon 2, 3 bzw. 8. Mögliche unabhängige Integrationsereignisse erscheinen mit >2 Banden. **(B)** Southern Blots mit genomischer DNA verschiedener Jurkat-Klone. Der Marker "M" ist der mit SmaI linearisierte Vektor plus der jeweiligen TCR-Umlagerung; ein zusätzlich verwendeter 1 kBp-Marker ist nicht gezeigt. Jurkatklone mit Einfachintegration zeigen ein einziges Fragment mit einer Mobilität von >4,2 kBp, jedoch nicht 5,8/6,1 kBp oder 8,4 kBp. Als Kontrollzellen für die klonspezifische PCR wurden die Jurkat-Klone c2#4, c3#10 und c8#23 ausgewählt.

Die Durchführung der "CDR3-Spektratyping"-Analyse erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Hohlfeld aus dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried. Es wurden mittels FACS gereinigte CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen separat untersucht. Hierbei zeigten die Spektrogramme der BV14-BJ1S1-Subpopulationen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beider Blutentnahmezeitpunkte jeweils einen auffälligen Peak (Abb. 5). Daß diese die Anwesenheit des CD8<sup>+</sup> Klon 10 (s. Tabelle IV) widerspiegeln, konnte durch Klonierung des PCR-Produkts und anschließende Sequenzierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien gezeigt werden (s. Legende zu Abb. 5). Aus der Größe der Peaks wurde unter Berücksichtigung der Sensitivität der "Spektratyping"-Technik geschlossen, daß Klon 10 mit einer ungefähren Häufigkeit von 1 in 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in beiden Blutproben vorkam. Andere Klone, die im Hirnmaterial als expandiert erkannt worden waren, konnten mit dieser Technik im Blut nicht nachgewiesen werden.

**3.2.2. Ein zweiter im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter CD8<sup>+</sup> Klon wurde mittels klonspezifischer PCR im Blut des Patienten detektiert**

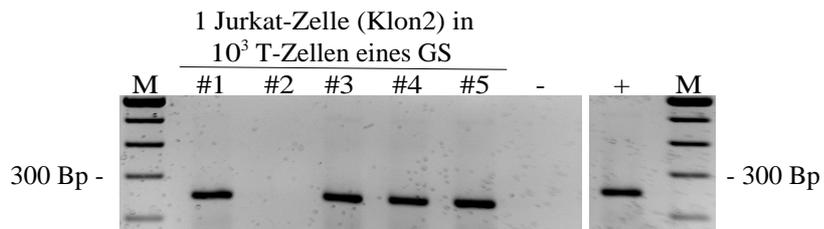
In einem zweiten Ansatz wurden Primer für die spezifische Amplifikation der TCR $\beta$ -Genumlagerungen der drei in situ identifizierten CD8<sup>+</sup> T-Zellklone 2, 3 und 8 (s. Tabelle IV) mittels einer sensitiven "seminested" PCR ausgewählt. Die drei Klone erschienen mit sechs (Klon 2) bzw. vier (Klone 3 und 8) erhaltenen Mitgliedern als am stärksten expandiert. Zur Etablierung einer jeden klonspezifischen PCR wurden Jurkat-Zellen eingesetzt, welche mit einer einzigen Kopie von einer der drei klonalen Umlagerungen stabil transfiziert worden waren (Abb. 6). In Abb. 7A ist die Vorgehensweise bei der Etablierung anhand der Klon 2- und 8-spezifischen PCR erläutert. Jede Kombination an klonspezifischen Primern war in der Lage, eine einzige Jurkat-Kontrollzelle unter 10<sup>3</sup> irrelevanten T-Zellen eines gesunden Spenders zu detektieren - 13 von 16 (im

Fall von Klon 2), 13 von 16 (Klon 3) bzw. 13 von 25 (Klon 8) solcher Proben waren für die spezifische Amplifikation der entsprechenden V-Region positiv -, was verglichen mit der "CDR3-Spectratyping"-Technik einer ähnlichen Sensitivität entspricht.

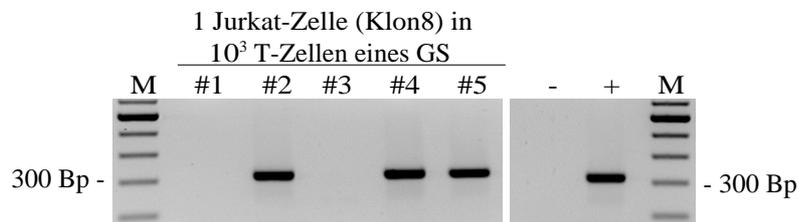
### A) Etablierung der klonspezifischen PCR

PCR spezifisch für:

Klon 2



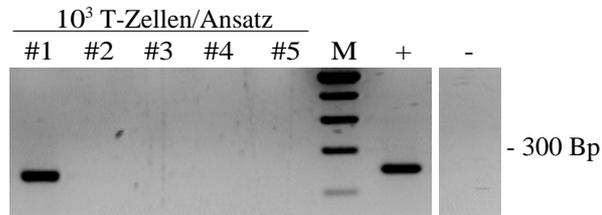
Klon 8



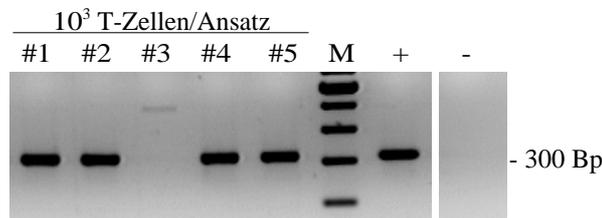
### B) Analyse der Blutprobe "31 mo" (Fall 2) mittels klonspezifischer PCR

PCR spezifisch für:

Klon 2



Klon 8



### Abb. 7 Die spezifische Amplifikation der TCR $\beta$ -Genumlagerungen der Klone 2 und 8 (identifiziert in Hirngewebe von Fall 2).

Um die spezifische Amplifikation der V-Regionen der Klone 2 und 8 etablieren und positiv kontrollieren zu können, wurden Jurkat-Zelllinien generiert, die genau eine Kopie jeder TCR $\beta$ -Umlagerung stabil in ihr Genom integriert trugen.

(A) Es wurden klonspezifische Primer etabliert und die Sensitivität der klonspezifischen PCR für die besondere Situation, in der nur eine einzige von 10<sup>3</sup> Zellen eine Kopie der klonalen Umlagerung trägt, bestimmt. Dazu wurden einzelne Jurkat-Kontrollzellen - "Jurkat-Zelle (Klon 2/8)" - mittels

FACS in PCR-Gefäße mit  $10^3$  irrelevanten, von einem gesunden Spender (GS) stammenden T-Zellen sortiert und mit Klon 2- und 8-spezifischer PCR analysiert. Es sind die Zweittrundenprodukte von je fünf Reaktionsansätzen (nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid) gezeigt (#1-#5). Die erwarteten Produktlängen sind 250 Bp für die Klon 2- und 311 Bp für die Klon 8-spezifische PCR. Die PCR-Produkte von insgesamt je fünf willkürlich ausgewählten Proben wurden sequenziert; bei einer jeden handelte es sich um die entsprechende klonale Umlagerung (für Ergebnisse der Etablierungsversuche s. Text). Als Positivkontrollen (“+”) dienten Ansätze mit einer einzelnen Jurkat-Kontrollzelle (Klon 2/8) ohne T-Zellen eines gesunden Spenders. Die Ansätze der Negativkontrollen (“-”) enthielten eine Jurkat-Zelle (Klon 3) und  $10^3$  T-Zellen eines gesunden Spenders. In keinem Fall wurde ein spezifisches Produkt von Proben mit irrelevanten T-Zellen in Abwesenheit einer entsprechenden Jurkat-Kontrollzelle erhalten.

**(B)** Für die Untersuchung der Blutprobe “31 mo” des Patienten 2 wurden Proben mit je  $10^3$   $CD8^+CD45RO^+$  Zellen einer Klon 2- oder 8-spezifischen PCR unterzogen. Die Zweittrundenprodukte von je fünf Reaktionsansätzen sind gezeigt (#1-#5). Alle PCR-Produkte  $\leq 350$  Bp wurden sequenziert, nämlich die der Proben #1 (Klon 2-spezifische PCR) sowie #1, #2, #4 und #5 (Klon 8-spezifische PCR). Es handelte sich in jedem Fall um die klonale V-Region. Proben mit Jurkat-Kontrollzellen, welche die entsprechende Umlagerung trugen (je zwei pro Reaktionsgefäß) plus  $10^3$   $CD8^+CD45RO^+$  Zellen eines gesunden Spenders wurden als Positivkontrollen (“+”) parallel analysiert. Die Ansätze der Negativkontrollen (“-”) enthielten zwei Jurkat-Zellen (Klon 3) und  $10^3$  T-Zellen eines gesunden Spenders.

Mit “M” ist ein 100 Bp-Marker bezeichnet.

Es wurde angenommen, daß expandierte  $CD8^+$  T-Zellklone der Population der Effektor-/Gedächtniszellen angehören und deshalb den Marker  $CD45RO$  ausprägen (Dutton et al., 1998). Es wurden  $10^2$  oder  $10^3$   $CD8^+CD45RO^+$  Zellen von beiden Blutproben (“12 mo” und “31 mo”) in eines von mehreren PCR-Gefäßen sortiert und Klon 2-, 3- und 8-spezifische PCR durchgeführt. Abb. 7B zeigt einen Teil der Resultate der Analyse von Blutprobe “31 mo” mit Klon 2- und 8-spezifischer PCR. Insgesamt wurden für jeden Klon und Blutentnahmezeitpunkt  $10^4$  Zellen getestet. Die V-Regionsequenz des Klons 8 wurde dabei aus sechs von 10 (Probe “12 mo”) und acht von 10 (Probe “31 mo”) Proben mit  $10^3$  Zellen sowie aus zwei von 20 Proben mit  $10^2$  Zellen amplifiziert (Probe “12 mo”; Tabelle VI). Bei sämtlichen PCR-Produkten handelte es sich, wie durch Sequenzierung bestätigt werden konnte, um die klonale V-Region. Dies bedeutet, daß Klon 8 im peripheren Blut zu beiden Blutentnahmezeitpunkten mit einer ungefähren Häufigkeit von 1 in  $10^3$   $CD8^+CD45RO^+$  T-Zellen vorkam. Die klonale Umlagerung des Klons 2 wurde nur einmal und die des Klons 3 kein einziges Mal aus den getesteten Proben erhalten (Tabelle VI).

Um zu überprüfen, ob die Klone 2 und 3 möglicherweise in hoher Frequenz in der Population der  $CD8^+CD45RO^-$  T-Zellen vorhanden waren, wurden je zwei Proben mit jeweils  $10^3$   $CD8^+CD45RO^-$  T-Zellen von Blut des Zeitpunkts “31 mo” mit Klon 2- und Klon 3-spezifischer PCR analysiert und für negativ befunden.

**Tabelle VI. Nachweis des Klons 8 (identifiziert in Hirngewebe von Fall 2) in CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen des peripheres Bluts mittels klonspezifischer PCR**

Blutprobe* / Anzahl der Zellen in PCR-Gefäß <sup>‡</sup>	PCR spezifisch für die V-Region von Klon #	Zellproben	
		mittels klonspezifischer PCR analysiert	positiv für spezifisches Produkt
12 mo / 10 <sup>3</sup>	2	10	0/10
31 mo / 10 <sup>3</sup>	2	10	1/10
12 mo / 10 <sup>3</sup>	3	9	0/9
12 mo / 5x10 <sup>2</sup>	3	1	0/1
12 mo / 10 <sup>2</sup>	3	5	0/5
31 mo / 10 <sup>3</sup>	3	10	0/10
12 mo / 10 <sup>3</sup>	8	10	6/10
31 mo / 10 <sup>3</sup>	8	10	8/10
31 mo / 10 <sup>2</sup>	8	20	2/20

Jede Primerkombination bestand aus dem TCRBV-spezifischen und einem Paar von "genesteten" CDR3-spezifischen Primern. Als Positivkontrollen für den Nachweis eines einzigen Moleküls in der klonspezifischen PCR dienten Jurkat-Zellen, welche eine Kopie der entsprechenden klonalen V-Regionsequenz im Genom integriert trugen. Einzelne dieser Jurkat-Kontrollzellen wurden in PCR-Gefäße mit 10<sup>2</sup> oder 10<sup>3</sup> (entsprechend der analysierten Testproben) irrelevanten CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen eines gesunden Spenders sortiert und zusammen mit T-Zellproben aus Blut des Falls 2 unter identischen Bedingungen analysiert.

\*an den angegebenen Zeitpunkten nach der Hirnbiopsie gewonnen

<sup>‡</sup> mittels FACS sortierte CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen

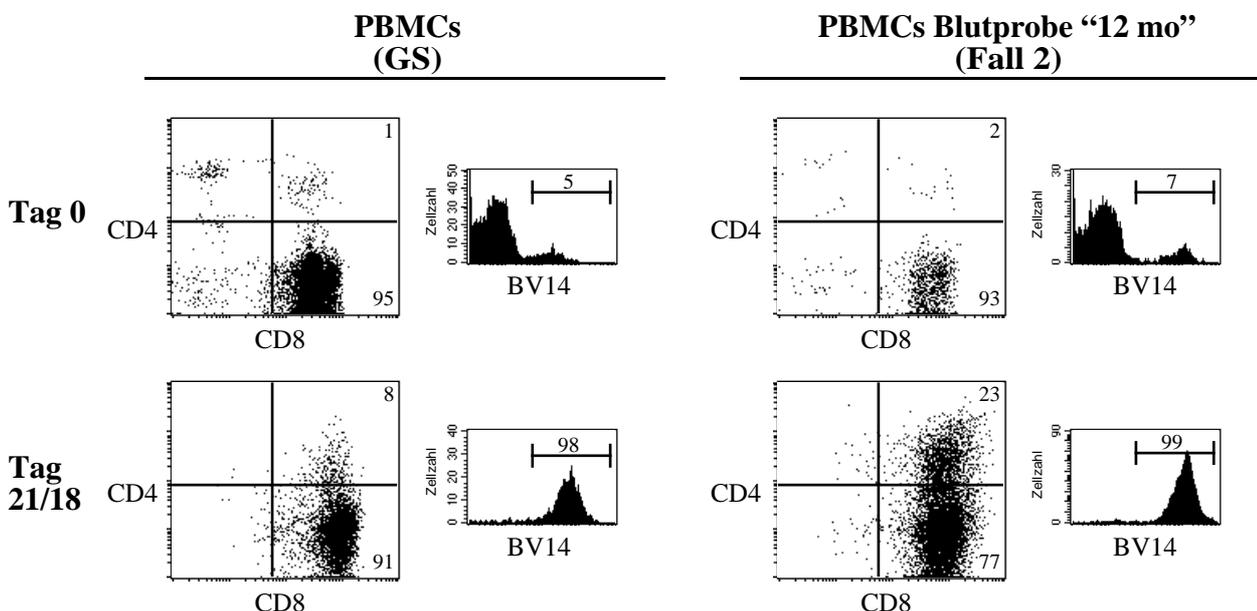
### ***3.2.3. Ein Nachweis der Klone 8 und 10 in (in vitro) expandierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Blutprobe "12 mo" von Fall 2 war nicht möglich***

Das Vorhandensein der Klone 8 und 10 in einer ungefähren Häufigkeit von 1 in 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Blutproben "12 mo" und "31 mo" des Patienten 2 sollte prinzipiell ihre Kultivierung und Isolierung zur Bestimmung der Antigenspezifitäten erlauben. Wegen der limitierten Mengen an noch verfügbaren Zellen (je 20 Mio kryopräservierte PBMCs beider Blutentnahmezeitpunkte) wurde ein Ansatz gewählt, der vor der eigentlichen Isolierung (d.h. Klonierung) der beiden Klone ihre vorherige in-vitro-Kultivierung mit Expansion und (eventueller) Anreicherung zum Ziel hatte. Maccalli et al. (1997) beschreiben eine Methode, mit deren Hilfe T-Zellen, die ein bestimmtes TCRBV-Segment ausprägen, selektiv aktiviert und expandiert werden können. Diese auf Stimulation mit anti-TCRBV- und anti-CD28-Antikörpern basierende Kulturtechnik wurde für den BV14S1<sup>+</sup> Klon 10 in veränderter Form (s. Abschnitt 2.12.) angewandt.

Ausgehend von 10 Mio kryopräservierten PBMCs der Probe "12 mo" wurden 1,5 x 10<sup>5</sup> mit MACS angereicherte CD8<sup>+</sup> T-Zellen für knapp drei Wochen in Stimula-

tionskultur genommen und mittels FACS-Analyse mit einer gleichartig behandelten Kultur von Zellen eines gesunden Spenders verglichen (Abb. 8). Nach etwa drei Wochen überlebten und proliferierten in beiden Fällen fast ausschließlich  $CD8^+BV14^+$  Zellen. Dies entsprach einer durchschnittlich 17fachen Anreicherung an  $BV14^+$  Zellen, was nach (Maccalli et al., 1997) in etwa zu erwarten war. Die Häufigkeit des Klon 10 sollte sich damit theoretisch auf  $>1\%$  steigern lassen. Es kam in solchen Kulturen zu einer mindestens 25fachen Expansion der Gesamtzellzahl (bestimmt an Tag 24 anhand von Kontrollkulturen). Nach fünf Wochen wurden durch Grenzverdünnung (3 Zellen/Napf; s. Abschnitt 2.13.) einzelne T-Zellklone bzw. oligoklonale T-Zelllinien generiert. 39 davon sowie alle Expansionskulturen wurden mittels Klon 10-spezifischer PCR auf die Anwesenheit des Klon 10 hin analysiert (s. Abschnitt 2.11.) und sämtlich für negativ befunden.

Da für den  $BV13S3^+$  Klon 8 kein geeigneter anti-BV-spezifischer Antikörper erhältlich war, mußte sich auf Expansionskulturen ohne Anreicherungseffekt beschränkt werden. Ausgehend von denselben 10 Mio kryopräservierten PBMCs der Probe "12 mo" wurden  $10^5$   $CD8^+$  T-Zellen mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern expandiert (nicht gezeigt). 75 durch Grenzverdünnung erhaltene Klone (bzw. Linien) sowie alle Expansionskulturen wurden mit Klon 8-spezifischer PCR getestet (s. Abschnitt 2.11.) und für negativ befunden.



**Abb. 8. FACS-Analyse von  $CD8^+$  T-Zellen vor und nach Expansion bzw. Selektion durch in-vitro-Kultur mit anti-BV14- und anti-CD28-Antikörpern**

$CD8^+$  T-Zellen eines gesunden Spenders (GS) bzw. des Patienten 2 (Blutprobe "12 mo") wurden mittels MACS angereichert und auf Gewebekulturplatten, die mit anti-BV14- und anti-CD28-Antikörpern beschichtet worden waren, in Kultur genommen. Zellaliquots wurden vor Beginn (Tag 0) und nach 21- (GS) bzw. 18-tägiger (Fall 2) in-vitro-Kultur gegen CD8, CD4 sowie TCRBV14 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Die in den Dot-Plots bzw. Histogrammen angegebenen Werte verstehen sich als Prozentanteile der innerhalb der entsprechenden Quadranten bzw. Markierungen befindlichen Zellen.

Da es in mehreren Versuchen nicht gelang, auch nur einen der beiden Klone in den Expansionskulturen nachzuweisen, wurde dieser Ansatz mit aus diesem Experiment stammenden Zellen nicht weiter verfolgt. Wegen der äußerst geringen Zellzahl vor Beginn der Expansion mußte zu diesem Zeitpunkt auf die Gewinnung genomischer DNA und somit auf Klon 8- und Klon 10-spezifische PCR verzichtet werden. Ob die PCR-Methodik zum Nachweis der beiden Klone unzulänglich war, ob eine u.U. eingeschränkte Lebensfähigkeit infolge der Kryopräservierung deren Kultur unmöglich machte oder ob die in-vitro-Expansionskultur nicht allen zu Beginn vorhandenen Klonen ein Auswachsen ermöglichte, wird sich erst in weiterführenden Experimenten klären lassen (s. Abschnitt 4.2.).

### **3.3. Etablierung und Anwendung einer 5'-RACE-Technik zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare für T-Zellklone der MS-Fälle 1 und 2**

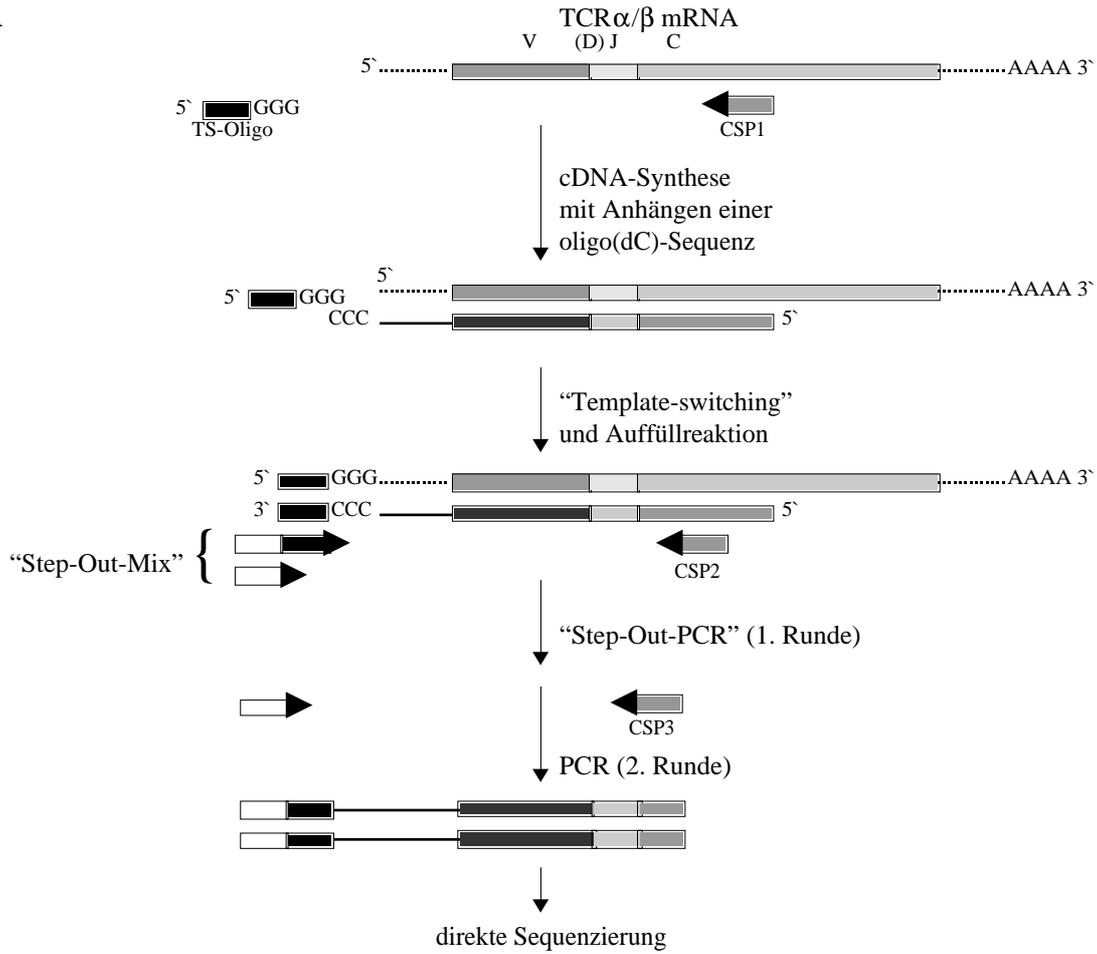
Ein komplementärer Ansatz, der die Aufklärung von Antigenespezifitäten von in situ expandierten T-Zellklonen aus beiden Fällen ermöglichen sollte, war die Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einzelnen mikromanipulierten Zellen. Auf diese Weise sollten für Klone, die im ersten Teil der Untersuchung als besonders stark expandiert erkannt worden waren, die TCR $\alpha$ -Ketten identifiziert werden. Dies sollte in zwei Schritten erfolgen. Zunächst wurde versucht, mRNA-Moleküle von TCR $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten aus einzelnen mikromanipulierten T-Zellen mittels RT-PCR gleichzeitig zu amplifizieren und direkt zu sequenzieren. Aus methodischen Gründen muß in einem zweiten Schritt verifiziert werden, daß die gefundenen Paare von V-Regionen (s. Abschnitt 3.3.2.) tatsächlich demselben Klon zuzuordnen sind. Dies soll durch unspezifische Voramplifikation der gesamten genomischen DNA mikromanipulierter Einzelzellen mit anschließender PCR unter Verwendung der passenden V-J-Primerpaare für beide Rezeptorketten geschehen (s. Abschnitte 4.3. und 4.4.).

### ***3.3.1. Etablierung einer 5'-RACE-Methode auf dem Niveau einzelner Zellen sowie auf mikromanipuliertem Material zum Zweck der Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen***

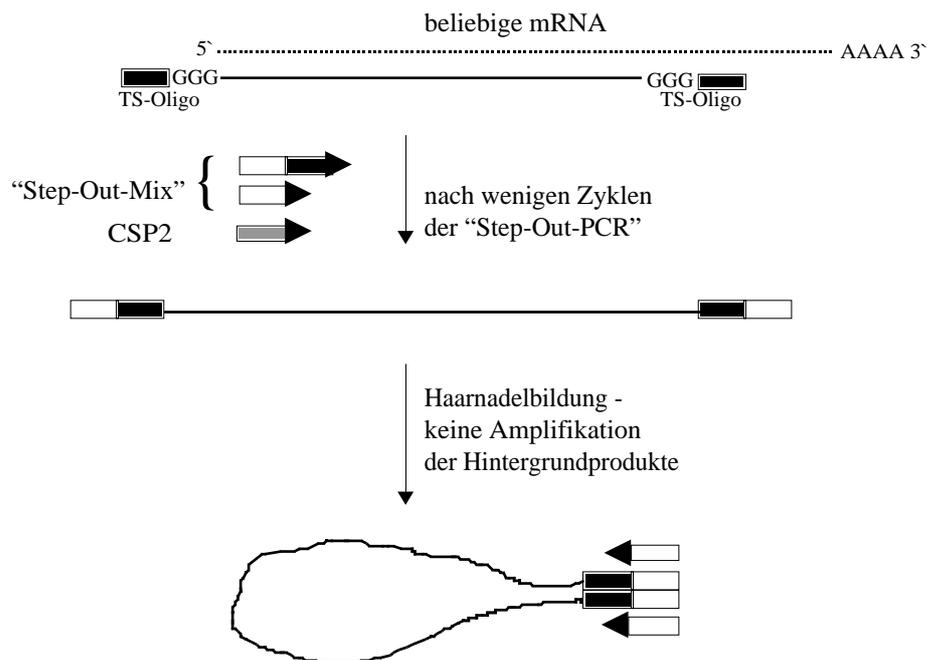
Die Notwendigkeit, TCR $\alpha$ -Genumlagerungen durch RT-PCR von mRNA-Molekülen anstatt, wie im Fall der TCR $\beta$ -Umlagerung, durch PCR von genomischer DNA zu amplifizieren, ergab sich durch die höhere Komplexität des TCR $\alpha$ - im Vergleich zum TCR $\beta$ -Lokus. Einer ähnlich großen Anzahl von ausprägbaren V-Segmenten (42 AV [EMBL/GenBank/DDBJ AE000658-AE000662] vs. 46 BV [Rowen et al., 1996]) steht eine erheblich größere Zahl von J-Segmenten gegenüber (61 AJ [EMBL/GenBank/DDBJ M94081] vs. 13 BJ [Rowen et al., 1996]). Zu diesem Zweck wurde eine 5'-RACE-Technik basierend auf dem sogenannten "Template-Switching"-Effekt und der "Step-Out-PCR" ([Matz et al., 1999]; Prinzip der Technik s. Abb. 9) auf die speziellen Bedingungen der Amplifikation aus einzelnen Zellen adaptiert. Strategie dieser 5'-RACE-Technik ist das Anhängen einer bestimmten Oligonukleotidsequenz an das 3'-Ende des während der RT frisch synthetisierten cDNA-Moleküls, welche in nachfolgenden PCR-Reaktionen als Universalprimersequenz dient. Prinzipiell ermöglicht dies die RT-PCR einer bestimmten mRNA-Spezies mit nur einem einzigen genspezifischen Primer. RT-PCR von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kettensequenzen aus einzelnen T-Zellen sollte somit mit Hilfe von drei zueinander "genesteten" TCRAC- bzw. TCRBC-spezifischen Primern gelingen, womit die Notwendigkeit, für die Amplifikation von TCR $\alpha$ -Umlagerungen mit beliebigen AV-AJ-Kombinationen eine große Anzahl von Primern einzusetzen, entfällt (Abb. 9A).

Die Etablierung der Reaktionsbedingungen erfolgte zunächst an RNA von Jurkat-Zellen (nicht gezeigt), dann an einzelnen sortierten T-Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders (Abb. 10A). Wie in Tabelle VII zusammenfassend gezeigt, lieferten bei 10 T-Zellen pro Reaktion alle getesteten Proben (5/5) in mindestens einer der PCR-Reaktionen zur Amplifikation der TCR $\alpha$ - oder TCR $\beta$ -Kettensequenzen ein Produkt, bei einer Zelle pro Reaktion waren 63% (22/35) positiv. Für beide PCR-Reaktionen zugleich waren vier Fünftel der Proben mit 10 Zellen (4/5) und 23% der Proben mit einer Zelle (8/35) positiv. Sequenzierung der Produkte der Proben mit nur einer Zelle, die sowohl in der TCR $\alpha$ - als auch TCR $\beta$ -PCR ein Amplifikat lieferten, zeigte, daß es sich in drei von 35 Fällen nicht immer auch tatsächlich um eine TCR $\alpha$ - oder TCR $\beta$ -Umlagerung handelte. Die erhaltene Sequenz für zumindest eine der beiden Ketten entsprach einem sogenannten Keimbahntranskript, also keiner für eine TCR-Kette kodierenden mRNA (s. Legende zur Abb. 10). In fünf der 35 Fälle (14%) war tatsächlich eine Koamplifikation sowohl der TCR $\alpha$ - als auch der TCR $\beta$ -Kettensequenz aus einer einzigen Zelle erfolgt.

A



B



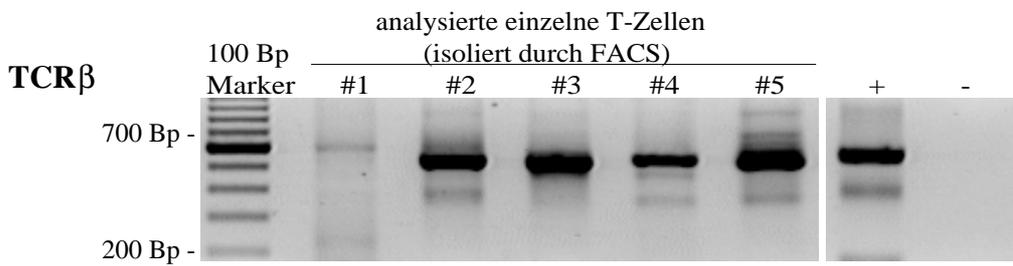
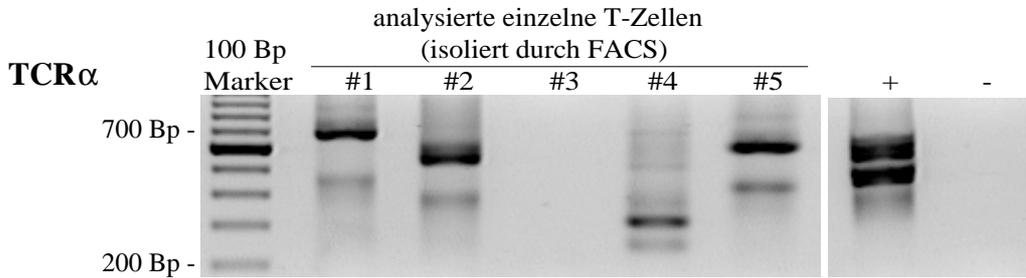
**Abb. 9. Das Prinzip der 5'-RACE mit "Template-Switching"-Effekt und "Step-Out-PCR".**

(A) Schematische Darstellung der RT-PCR von TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Ketten-Transkripten. Nach Priming der cDNA-Erststrangsynthese durch Oligonukleotide mit Spezifitäten für die C-Segmente von mRNA-Molekülen der TCR $\alpha$ - oder  $\beta$ -Ketten ("C-spezifische Primer", CSP) und RT der TCR-Transkripte hängt eine spezielle "Moloney Murine Leukemia Virus"-reverse-Transkriptase einige wenige Nukleotide (v.a. Cytosin) ohne Vorlage an das 3'-Ende des neu synthetisierten cDNA-Strangs. Das "Template-Switch" (TS)-Oligonukleotid mit einer oligo(G)-Sequenz an dessen 3'-Ende paart mit der Endsequenz der cDNA. Die Oligosequenz wird von der reversen Transkriptase nun als neue Vorlage zur Komplettierung des cDNA-Moleküls benutzt (womit sie die komplementäre Sequenz des Oligos inkorporiert). Um die Amplifikation von unerwünschten Hintergrundmolekülen zu verhindern (s. Abb. 9B), wird in der ersten Runde der PCR ein "genesteter" CSP sowie der sogenannte "Step-Out-Mix" eingesetzt. Ein langes, mit seiner 3'-Hälfte der TS-Oligosequenz entsprechendes Oligonukleotid ("Heel-Carrier") besorgt während der ersten Zyklen der PCR den Einbau einer neuen 5'-gelegenen Sequenz, während das zweite, dieser neuen Sequenz entsprechende Oligo ("Heel-PCR") - in hoher Konzentration vorliegend - die effiziente Amplifikation des durch den CSP geprimten Produkts ermöglicht. Nach einer zweiten PCR-Runde kann das erhaltene Produkt direkt sequenziert werden. Die RT von mRNA-Molekülen beider Ketten findet hierbei im gleichen PCR-Gefäß statt, während die PCR-Reaktionen unter Verwendung von jeweils der Hälfte des RT-Produkts als Vorlage in separaten Reaktionsansätzen ablaufen. Die verwendeten TCRBC-spezifischen Primer sind in der Lage, beide ausprägbaren C-Segmente (C1 und C2) zu erkennen. Diese Strategie erlaubt prinzipiell auch die reverse Transkription und Amplifikation fragmentierter mRNA-Moleküle. (B) Unterdrückung der Amplifikation von Hintergrundprodukten mittels "Step-Out-PCR". Das TS-Oligo tendiert während der RT-Reaktion zu unspezifischem Paaren mit beliebigen mRNA-Molekülen, so daß es als Primer für die RT von unerwünschtem Hintergrund fungiert. In der nachfolgenden PCR käme es, setzte man einen Primer mit der Sequenz des TS-Oligos ein, nur durch diesen zu einer dramatischen Amplifikation der Hintergrundmoleküle. Durch Verwendung des "Step-Out"-Primermixes werden diese Moleküle während der ersten PCR-Zyklen mit invertierten terminalen Wiederholsequenzen versehen, was zur Bildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen führt. Diese sind durch einen Primer, dessen Sequenz der distalen Hälfte der Wiederholsequenz entspricht, nicht amplifizierbar (Darstellung nach [Matz et al., 1999], verändert).

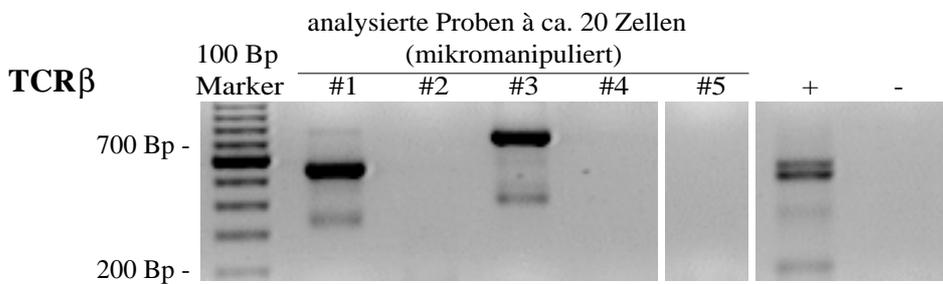
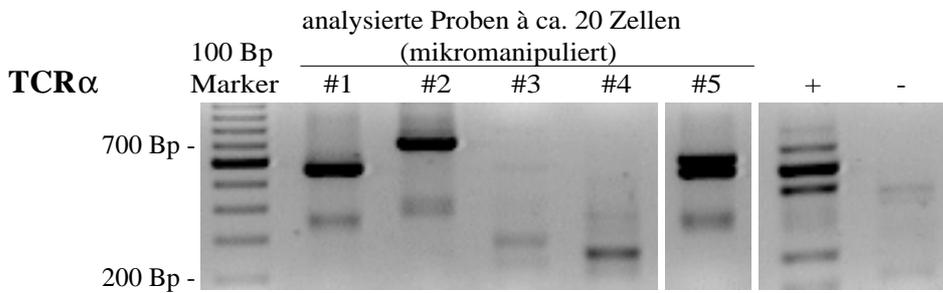
Zur Etablierung dieser Technik auf mikromanipuliertem Material wurden T-Zell-reiche Proben (s.u.) aus Gefrierschnitten einer Tonsille Laser-vermittelt isoliert, in ein PCR-Gefäß transferiert und mittels 5'-RACE analysiert. Da immunhistochemische Techniken bekanntermaßen mit der Integrität von RNA interferieren, waren die Schnitte nur mit Hämalaun gefärbt worden (was für eine Orientierung unter dem Mikroskop ausreichend war). Die Proben wurden aus den zwischen den B-Zell-reichen Keimzentren liegenden T-Zell-reichen Regionen gewonnen. Während von zwei Dritteln der Proben mit 10 Zellen sowohl in der TCR $\alpha$ - als auch TCR $\beta$ -PCR spezifische Produkte erhalten wurden (12/18; Tabelle VII), war dies bei keiner der nur eine Zelle enthaltenden Proben der Fall (0/6). Von den sechs der 28 analysierten Proben mit drei Zellen, die in den PCR-Reaktionen für beide Ketten zugleich positiv waren, verblieben nach der Verifizierung durch Sequenzierung der Produkte zwar nur zwei (7%), ein Viertel der Proben (7/28) lieferte jedoch zumindest eine TCR $\alpha$ - oder eine TCR $\beta$ -Umlagerung. Zu berücksichtigen ist, daß es sich nicht bei jeder der gepickten Zellen tatsächlich auch um eine T-Zelle handelte.

Daher erschien die 5'-RACE-Technik für die Analyse von Patientenproben zur Identifizierung von möglichen TCR $\alpha$ -Partnerketten ("Kandidaten- $\alpha$ -Ketten") für die TCR $\beta$ -Ketten stark expandierter T-Zellklone geeignet.

### A) T-Zellen eines gesunden Spenders



### B) Proben aus der MS-Läsion von Fall 2



**Abb. 10. Die 5'-RACE-Technik basierend auf dem "Template-Switching"-Effekt und der "Step-Out-PCR" zur RT-PCR von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen auf dem Niveau einzelner Zellen.**

Die zu analysierenden Zellen wurden in PCR-Gefäße transferiert und die Gesamt-RNA extrahiert. Zur RT-PCR der mRNA-Moleküle von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen wurde die 5'-RACE-Technik mit "Template-Switching"-Effekt und anschließender "Step-Out-PCR" (unter Verwendung von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -spezifischen Oligonukleotiden) nach dem in Abb. 9 dargestellten Prinzip angewandt. Alle auf dem Agarosegel klar zu identifizierenden Produkte mit einer Länge von 200-750 Bp wurden direkt sequenziert. Die Abbildungen zeigen Zweitrundenprodukte nach TCR $\alpha$ -spezifischer (oben) und TCR $\beta$ -spezifischer 5'-RACE (unten) nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid. Ein Grund für die teilweise unterschiedlichen Produktlängen ist die reverse Transkription und Amplifikation fragmentierter mRNA-Moleküle.

In **(A)** sind die RT-PCR-Produkte von fünf analysierten, mittels FACS in PCR-Gefäße sortierten Einzelzellen eines gesunden Spenders abgebildet (#1-#5). Die Sequenzierung der (klar zu identifizierenden) Produkte zeigte, daß für die Zellen #2 und #5 je eine potentiell funktionelle TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Umlagerung koamplifiziert worden war, während für die Zelle #1 in der TCR $\alpha$ -spezifischen 5'-RACE zwar eine TCR $\alpha$ -Umlagerung, in der TCR $\beta$ -spezifischen 5'-RACE jedoch ein nicht informatives Keimbahntranskript erhalten wurde (schwache Bande bei  $\approx$  600 Bp). Für Zelle #4 war in der TCR $\beta$ -spezifischen 5'-RACE eine TCR $\beta$ -Umlagerung, in der TCR $\alpha$ -spezifischen 5'-RACE hingegen ein Keimbahntranskript (Bande bei 300 Bp) amplifiziert worden. Bei den Keimbahntranskripten war das C-Segment zwar an das J-Segment gespleißt, das J-Segment lag jedoch in der Keimbahnkonfiguration vor (d.h. keine VJ-Umlagerung); das 5'-Ende dieser Transkripte lag im Intronbereich 5' des jeweiligen J-Segments. Mit "+" ist die Positivkontrolle (10 sortierte Zellen eines gesunden Spenders), mit "-" die Negativkontrolle (10 sortierte Zellen, Ansätze jedoch ohne reverse Transkriptase) bezeichnet.

**(B)** zeigt die RT-PCR-Produkte von fünf analysierten Proben mit jeweils etwa 20 parenchymalen Zellen, die Laser-vermittelt aus Läsionen eines Hämalaun-gefärbten Schnitts von MS-Fall 2 manipuliert und in PCR-Gefäße katapultiert worden waren. Bei den Proben #1, #2, #3 und #5 handelt es sich um die in Tabelle VIII dargestellten Proben #3, #4, #5 und #6 (Fall 2). Bei Probe #1 war, wie die Sequenzierung der klar zu identifizierenden Produkte ergab, sowohl eine TCR $\alpha$ - als auch eine TCR $\beta$ -Umlagerung (CD8<sup>+</sup> Klon 3) amplifiziert worden, während bei Probe #2 eine TCR $\alpha$ -, bei Probe #3 eine TCR $\beta$ -Umlagerung (CD8<sup>+</sup> Klon 16) und bei Probe #5 zwei TCR $\alpha$ -Umlagerungen erhalten wurden. Bei der Bande der Probe #4 in der TCR $\alpha$ -spezifischen 5'-RACE (250 Bp) handelt es sich um ein unspezifisches Amplifikat bakteriellen Ursprungs. Als Positivkontrolle dienten 10 sortierte Zellen eines gesunden Spenders, als Negativkontrolle eine Gewebeprobe aus der der Läsion benachbarten, nicht erkrankten grauen Substanz.

**Tabelle VII. Etablierung der 5'-RACE-Technik basierend auf dem "Template-Switching"-Effekt und der "Step-Out-PCR" auf dem Niveau einzelner Zellen sowie auf mikromanipuliertem Material**

Anzahl der Zellen je Probe		Probe positiv in			
		TCR $\alpha$ - PCR	TCR $\beta$ - PCR	TCR $\alpha$ - ODER $\beta$ -PCR	TCR $\alpha$ - UND $\beta$ -PCR
<u>isoliert durch FACS<sup>a</sup></u>					
10 <sup>b</sup>	spezifische Produkte	4/5	5/5	5/5	4/5
1	spezifische Produkte	13/35	14/35	22/35 (63%)	8/35 (23%) <sup>c</sup>
	verifizierte Umlagerungen				5/35 (14%)
<u>mikromanipuliert<sup>d</sup></u>					
10 <sup>e</sup>	spezifische Produkte	13/18 (72%)	15/18 (83%)	16/18 (89%)	12/18 (67%)
3 <sup>c</sup>	spezifische Produkte	8/28 (29%)	8/28 (29%)	10/28 (36%)	6/28 (21%)
	verifizierte Umlagerungen	6/28 (21%)	3/28 (11%)	7/28 (25%)	2/28 (7%)
1 <sup>c</sup>	spezifische Produkte	2/6	0/6	2/6	0/6
	verifizierte Umlagerungen	1/6		1/6	

Es wurden entweder einzelne T-Zellen eines gesunden Spenders mittels FACS in PCR-Gefäße sortiert oder Proben von Zellen aus T-Zell-reichen Bereichen einer Tonsille Laser-unterstützt mikromanipuliert und in PCR-Gefäße transferiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA jeder Probe wurde die 5'-RACE-Technik zur Synthese von cDNA mit anschließender "Step-Out-PCR" nach dem in Abb. 9 dargestellten Prinzip angewandt. Alle Reaktionen, die (auf dem Agarosegel klar zu identifizierende) Produkte mit einer Länge von 200-750 Bp lieferten, wurden der Rubrik "spezifische Produkte" zugeordnet. Alle mit "c" bezeichneten PCR-Produkte wurden direkt sequenziert. Diejenigen Proben, welche tatsächlich eine TCR-Genumlagerung lieferten, wurden der Rubrik "verifizierte Umlagerungen" zugeordnet. Bei allen anderen Produkten handelte es sich um nicht informative Keimbahntranskripte, bei denen das C-Segment zwar an das J-Segment gespleißt war, das J-Segment jedoch in der Keimbahnkonfiguration vorlag.

<sup>a</sup>Von fünf Negativkontrollen (Proben mit 10 sortierten T-Zellen; Ansätze jedoch ohne reverse Transkriptase) waren alle für ein spezifisches Produkt negativ.

<sup>b</sup>In nachfolgenden Experimenten unter modifizierten Bedingungen (s. Abschnitt 2.14.) waren 15/16 Proben mit 10 sortierten T-Zellen (als Positivkontrollen für die Analyse mikromanipulierter Zellen) für mindestens eine der beiden Ketten und 13/16 für beide Ketten positiv.

<sup>d</sup>Die angegebene Zellzahl gibt die Zahl der Zellkerne an, die aus den Hämalaun-gefärbten Schnitten mikromanipuliert wurden. Die 5'-RACE-Analyse von mikromanipulierten Proben erfolgte im Vergleich zu der von sortierten Zellen unter modifizierten Bedingungen (s. Abschnitt 2.14.). Von neun Negativkontrollen (Proben der Polyethylenfolie aus unmittelbarer Nachbarschaft des Schnitts) waren alle für ein spezifisches Produkt negativ.

<sup>e</sup>Die Sequenzierung von je 4 Produkten aus der TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -PCR ergab in jedem Fall die Sequenz einer TCR $\alpha$ - bzw. TCR $\beta$ -Umlagerung.

### ***3.3.2. Amplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kettensequenzen aus mikromanipulierten T-Zellen der MS-Fälle 1 und 2 mittels 5'-RACE zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare***

Um entweder die TCR $\alpha$ - und  $\beta$ -Kettensequenzen von stark expandierten Klonen aus einer Zelle zugleich zu amplifizieren - ein Ereignis, das aufgrund der in Abschnitt 3.3.1. erhaltenen Frequenzen für mikromanipulierte Zellen eher selten zu erwarten war - oder Kandidaten- $\alpha$ -Ketten für diese Klone zu identifizieren, wurden Zellproben aus Läsionen beider MS-Fälle Laser-vermittelt mikromanipuliert und mittels 5'-RACE analysiert. Ziel war es, einzelne oder wenige T-Zellen ohne vorherige immunhistologische Färbung der Gewebsschnitte in der Analyse einzusetzen. Daher wurden die ungefähren Häufigkeiten von einzelnen im Hirnparenchym lokalisierten T-Zellen in Schnitten bestimmt, die gegen CD3 gefärbt worden waren ( $\geq 500$  Zellen gezählt). In den Läsionen 1 und 2 von Fall 1 war etwa jede 40-50ste Zelle eine T-Zelle, in Fall 2 etwa jede 20ste. Daher wurden in Fall 1 zumeist Proben mit etwa 40, in Fall 2 Proben mit etwa 20 Zellkernen aus Hämalaun-gefärbten Schnitten gewonnen. In Abb. 10B sind die RT-PCR-Produkte von fünf mit TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -spezifischer 5'-RACE analysierten Proben (mikromanipuliert aus der Läsion von Fall 2) exemplarisch gezeigt, und in Tabelle VIII sind sämtliche bisher erhaltenen TCR $\alpha$ - und  $\beta$ -Umlagerungen aufgeführt. In Fall 1 waren 6/47 (13%) Proben à 40 Zellen für zumindest eine der beiden Ketten und 3/47 (6%) für beide Ketten zugleich positiv (Proben mit weniger Zellen hier nicht berücksichtigt), während dies in Fall 2 für 12/53 (23%) bzw. 5/53 (9%) Proben à 20 Zellen zutrifft. Insgesamt wurden neben zahlreichen TCR $\beta$ -Umlagerungen, die bereits in der Repertoiranalyse (s. Abschnitt 3.1.) ein- oder mehrfach erhalten worden waren, für Fall 1 sechs und für Fall 2 11 Kandidaten- $\alpha$ -Kettensequenzen amplifiziert. Hierbei kam die  $\alpha$ -Umlagerung AV23S1-AJ39 (Fall 1) als einzige mehrfach (nämlich dreimal) vor, dies allerdings zusammen mit verschiedenen TCR $\beta$ -Umlagerungen, unter anderem mit der des zweitgrößten (CD8<sup>+</sup>) Klons 9.

In zukünftigen Experimenten ist nun - wie in den Abschnitten 4.3. und 4.4. erläutert - zu klären, welche Paare von Genumlagerungen tatsächlich von in situ identifizierten T-Zellklonen ausgeprägt wurden.

**Tabelle VIII. Zusammenfassung der 5'-RACE-Analyse von mikromanipulierten T-Zell-reichen Proben aus MS-Läsionen der Fälle 1 und 2.**

Probe #	TCR-Kette	Umlagerung	potentiell funktionell	Klon (Häufigkeit)
<b>Fall 1</b>				
<b>1</b>	$\alpha$	<b>AV23S1-AJ39</b>	+	
	$\alpha$	<b>AV22S1-AJ22</b>	-	
	$\beta$	<b>BV13S6-BJ2S7</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 18 (4)</b>
2	$\beta$	BV14S1-BJ1S2	+	
3	$\beta$	BV6S5-BJ1S2	+	CD8 <sup>+</sup> Klon 1 (53)
4	$\beta$	BV4S1-BJ1S3	+	
5	$\alpha$	AV19S1-AJ40	+	
<b>6</b>	$\alpha$	<b>AV23S1-AJ39</b>	+	
	$\beta$	<b>BV5S6-BJ2S5</b>	+	
	$\beta$	<b>BV9S1/2-BJ2S1</b>	+	
7	$\alpha$	<b>AV23S1-AJ39</b>	+	
	$\beta$	<b>BV12S2-BJ1S5</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 9 (8)</b>
8	$\alpha$	<b>AV17S1-AJ4</b>	-	
	$\beta$	<b>BV2S1-BJ1S6</b>	+	
9	$\alpha$	AV1S4-AJ12	+	
10	$\alpha$	AV17S1-AJ29	-	
<b>Fall 2</b>				
<b>1</b>	$\alpha$	<b>AV14S1-AJ40</b>	+	
	$\beta$	<b>BV5S6-BJ2S7</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 16 (4)</b>
2	$\alpha$	<b>AV14S1-AJ55</b>	+	
	$\beta$	<b>BV2S1-BJ2S2</b>	+	<b>CD4<sup>+</sup> Klon 17 (2)</b>
3	$\alpha$	<b>AV15S1-AJ4</b>	+	
	$\beta$	<b>BV13S2/9-BJ2S1</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 3 (6)</b>
4	$\alpha$	AV1S1-AJ31	+	
5	$\beta$	BV5S6-BJ2S7	+	CD8 <sup>+</sup> Klon 16 (4)
6	$\alpha$	AV4S2-AJ29	+	
	$\alpha$	AV21S1-AJ9	+	
7	$\beta$	BV6S4-BJ2S7	+	
8	$\alpha$	<b>AV8S1-AJ39</b>	+	
	$\beta$	<b>BV13S2/9-BJ2S1</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 3 (6)</b>
9	$\alpha$	AV16S1-AJ34	+	
10	$\beta$	BV13S1-BJ2S3	+	CD8 <sup>+</sup> Klon 6 (3)
11	$\beta$	BV16S1-BJ2S3	+	
<b>12</b>	$\alpha$	<b>AV3S1-AJ11</b>	+	
	$\beta$	<b>BV5S6-BJ2S7</b>	+	<b>CD8<sup>+</sup> Klon 16 (4)</b>
13	$\alpha$	AV19S1-AJ33	+	
14	$\alpha$	AV30S1-AJ41	+	

Proben von Zellen aus Läsionen der MS-Fälle 1 und 2 - Läsionsgrenzen waren im Hämalaun-gefärbten Schnitt gut auszumachen - wurden Laser-vermittelt mikromanipuliert und in PCR-Gefäße katapultiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA jeder Probe wurde die 5'-RACE-Technik zur Synthese von cDNA mit anschließender "Step-Out-PCR" nach dem in Abb. 9 dargestellten Prinzip angewandt. Alle Produkte mit einer Länge von 200-750 Bp wurden direkt sequenziert. Sämtliche Proben, welche eine TCR-Genumlagerung lieferten, sind in der Tabelle aufgelistet und es werden die umgelagerten V- und J-Segmente genannt. Proben, für die TCR $\alpha$ - als auch TCR $\beta$ -Kettensequenzen erhalten wurden, sind

fett/kursiv gedruckt. Es ist angegeben, ob die erhaltene Sequenz potentiell für eine funktionelle TCR-Kette kodiert und ob die jeweilige TCR $\beta$ -Umlagerung bereits im Rahmen der Repertoireanalyse (s. Abschnitt 3.1.) amplifiziert worden war. Die Nummerierung der Klone wurde fortgeführt und deren Häufigkeit (TCR $\beta$ -PCR auf chromosomaler DNA plus 5'-RACE) angegeben.

Für Fall 1 wurden 14 Proben mit jeweils etwa 10 perivaskulären Zellen aus der Läsion 3, 14 Proben mit je etwa 20 bzw. 47 Proben mit je etwa 40 parenchymalen Zellen aus den Läsionen 1 und 2 sowie für Fall 2 53 Proben mit jeweils etwa 20 parenchymalen Zellen analysiert. Als Negativkontrollen wurden 11 Gewebeprobe von etwa der gleichen Größe aus der den Läsionen benachbarten, nicht erkrankten grauen Substanz parallel analysiert. Keine lieferte eine TCR-Umlagerung.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in aktiv demyelinisierenden Hirnläsionen zweier MS-Patienten auf dem Niveau einzelner Zellen untersucht. Um die Antigen-spezifitäten ausgewählter T-Zellklone bestimmen zu können, wurde im Blut des Patienten 2 nach in situ identifizierten T-Zellklonen gefahndet und versucht, die zwei bei dieser Analyse identifizierten zu kultivieren und zu isolieren. Zum selben Zweck wurden in einem komplementären (für beide Fälle geeigneten) Ansatz eine 5'-RACE-Technik zur Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einzelnen Zellen etabliert und auf diese Weise mögliche Rezeptorkettenpaare identifiziert.

### 4.1. Die klonale Zusammensetzung und das TCR-Repertoire des T-Zellinfiltrats von Hirnläsionen zweier MS-Fälle

#### 4.1.1. Auswahl des Materials

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. H. Lassmann, Institut für Hirnforschung, Wien, wurde unter Autopsie- und Biopsiematerial mehrerer MS-Fälle nach Gewebeproben gesucht, die Areale mit aktiver Demyelinisierung nebst dichten T-Zellinfiltraten aufwiesen. In der Vergangenheit verwendete Kriterien für die Aktivität des Entmarkungsprozesses waren in ihrer Bedeutung häufig kontrovers und bisweilen irreführend. Daher wurde vor kurzem ein neues (leistungsfähiges) Klassifizierungsschema vorgeschlagen, das die molekulare Zusammensetzung von Myelinabbauprodukten in Makrophagen und die Expression bestimmter Aktivierungsmarker durch Makrophagen zugrundelegt (Lucchinetti et al., 1996). So erlaubt das Auffinden von Makrophagen, die positiv für beispielsweise MOG- und PLP-Abbauprodukte und den akuten Entzündungsmarker 27E10 sind - diese Kriterien kamen in der vorliegenden Analyse zur Anwendung - eine Einteilung der betreffenden Gewebsregion als "aktiv demyelinisierend" (Brück et al., 1995; Brück et al., 1994; Lucchinetti et al., 1996). Das bedeutet, daß der Entmarkungsprozess dieses Läsionsbereichs nicht älter als etwa 10 Tage ist (Brück et al., 1995). Diese verfeinerte Klassifizierungsmethodik kam im Vergleich zu früheren Repertoireanalysen (Birnbaum und van Ness, 1992; Oksenberg et al., 1993; Oksenberg et al., 1990; Wucherpfennig et al., 1992) hier erstmalig zum Einsatz.

Aktive Läsionen - in Hirnmaterial, das post mortem gewonnen wurde, generell und insbesondere in Form von Gefrierbewebe selten (Lassmann et al., 1998; Sobel, 1989) - wurden im Autopsiematerial von Fall 1 gefunden. Eine große aktiv demyelinisierende Läsion war auch im Resektat von Fall 2 vorhanden. Bei diesem Fall handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein frühes Stadium der Krankheitsentwicklung, da die Biop-

sie bereits zwei Wochen, nachdem der Patient klinisch auffällig geworden war, gewonnen wurde. Eine Situation, bei der ein großer Teil einer aktiven Läsion als Gefriermaterial und gleichzeitig Blutproben des Patienten zur Verfügung stehen, liegt ausgesprochen selten vor.

#### **4.1.2. Verlässlichkeit der Einzelzell-PCR**

Einzelne CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus immunhistochemisch gefärbten Gefrierschnitten mikromanipuliert und ihre TCR $\beta$ -Genumlagerungen mittels "single target"-PCR amplifiziert. Von dieser PCR-Methode, in der ein komplexes Gemisch aus TCRBV- und TCRBJ-spezifischen Primern eingesetzt wird, wurde bereits früher gezeigt, daß mit ihr die verschiedenen V-J-Kombinationen einzelner Zellen verlässlich amplifizierbar sind ([Roers et al., 2000; Roers et al., 1998; Willenbrock et al., 2000] und Daten nicht gezeigt). Da einzelne Moleküle nachgewiesen werden sollen, muß zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse Kontamination durch einzelne Moleküle stringent kontrolliert werden. Als Negativkontrollen dienten in der vorliegenden Arbeit: i) Astrozyten zur Kontrolle zellulärer Kontamination während der Mikromanipulations-Prozedur, ii) Proben des Puffers, der die Schnitte während der Mikromanipulations-Prozedur bedeckte, um Kontamination durch unabsichtlich mobilisierte Zellfragmente und PCR-Produkte aus früheren Experimenten zu kontrollieren, sowie iii) PCR-Ansätze ohne jegliches Probenmaterial (Wasser-Kontrollen) ebenfalls zur Kontrolle von PCR-Produkt-Kontamination. Alle Kontrollen blieben für ein spezifisches Produkt negativ (s. Abschnitt 3.1.2.). Außerdem spricht gegen das Auftreten von Kontaminationen in der vorliegenden Untersuchung, daß von den einzelnen sortierten T-Zellen, die als Positivkontrollen dienten, alle spezifischen Produkte in der gesamten Analyse nur einmal erhalten wurden.

Sowohl die Resultate der Kontrollexperimente als auch die erhaltenen Effizienzen (einzelne sortierte T-Zellen 73%, einzelne parenchymale T-Zellen aus beiden MS-Fällen 29%, s. Abschnitt 3.1.2.) stimmen, was die Verlässlichkeit dieser PCR-Technik angeht, mit den vorliegenden Erfahrungen überein. Dies gilt insbesondere i) für die Zuordnung der erhaltenen Sequenzen zu einzelnen Zellen ([Roers et al., 2000; Roers et al., 1998; Willenbrock et al., 2000] und Daten nicht gezeigt) sowie ii) für die Repräsentation der meisten ausprägbaren BV- und BJ-Segmente; die Häufigkeiten dieser Segmente in der vorliegenden Sequenzkollektion ähneln nämlich denen in anderen, mit dieser Technik erhaltenen Sequenzkollektionen genauso weitgehend ([Roers et al., 2000; Roers et al., 1998; Willenbrock et al., 2000] und Daten nicht gezeigt) wie früher publizierten Mustern (Hall und Lanchbury, 1995; Rosenberg et al., 1992). Weiterhin spricht für die Verlässlichkeit des gewählten Ansatzes, daß Genumlagerungen, welche von mikromanipulierten CD8<sup>+</sup> Zellen erhalten wurden, niemals unter CD4<sup>+</sup> Zellen (oder umgekehrt) zu finden waren; und dies, obwohl bestimmte TCR $\beta$ -V-Regionsequenzen häufig auftauchten (Klon 1 [Fall 1] wurde z.B. 52 mal erhalten). Zudem werden die in

der Repertoireanalyse erhobenen Daten durch die Ergebnisse der 5'-RACE-Analyse bestätigt (s. Abschnitt 4.3.).

#### **4.1.3. Das T-Zellinfiltrat in aktiven MS-Läsionen**

Gefrierschnitte wurden immunhistologisch gegen CD4 und CD8 gefärbt. In beiden Fällen fanden sich im Parenchym aller untersuchten Läsionen weitaus mehr CD8<sup>+</sup> als CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zahlreiche frühere Studien beschrieben das Vorkommen dieser T-Zellsubpopulationen in MS-Läsionen. Hierbei fanden sich in einigen Studien mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Booss et al., 1983; Hauser et al., 1986; Hayashi et al., 1988; McCallum et al., 1987; Woodrooffe et al., 1986; Wucherpfennig et al., 1992), in anderen hingegen mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Hofman et al., 1986; Sobel et al., 1988; Traugott et al., 1983b). Die Frage nach dem Vorherrschen der CD8<sup>+</sup> oder der CD4<sup>+</sup> Subpopulation in MS-Läsionen ist nach wie vor offen, zumal die Studien aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Färbetechniken, Zählstrategien und Methoden zur Bestimmung des Aktivitätszustands der Läsionen nur eingeschränkt vergleichbar sind (Sobel, 1989).

Der in der vorliegenden Untersuchung gewählte Ansatz der Kombination von Mikro-manipulation, TCR $\beta$ -Einzelzell-PCR und direkter Sequenzierung der amplifizierten V-Regionen ermöglichte eine Charakterisierung der T-Zellinfiltrate in MS-Läsionen mit einer bisher noch nicht beschriebenen Auflösung. Die erhaltenen Sequenzen konnten einzelnen T-Zellen, die an einer bestimmten Stelle im erkrankten Gewebe lokalisiert waren, zugeordnet werden. Dies ließ eine vergleichende Analyse der Zusammensetzung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen in perivaskulären Aggregaten und im Parenchym von aktiven und inaktiven Läsionen zu. Die Ansätze früherer Arbeiten fußten auf Analysen von Gesamt-RNA, die aus ganzen Gewebeblöcken extrahiert worden war. Nach der Synthese von cDNA wurden TCR $\alpha$ - oder TCR $\beta$ -Genumlagerungen in separaten Reaktionen mit Primern für die verschiedenen Familien der TCRAV- oder TCRBV-Gensegmente und mit einem TCRAC- oder TCRBC-spezifischen Primer amplifiziert (Birnbaum und van Ness, 1992; Oksenberg et al., 1993; Oksenberg et al., 1990; Wucherpfennig et al., 1992). Im Gegensatz zum Ansatz der vorliegenden Arbeit liefert diese Vorgehensweise nur semiquantitative Daten. So ist es für die Auswertung solcher Daten notwendig, die zu analysierende Probe mit einer zweiten, beispielsweise einer Kontrollkollektion von T-Zellen gesunder Spender, zu vergleichen. Zudem können die Ergebnisse der Familien-spezifischen PCR-Reaktionen aufgrund unterschiedlicher Effizienzen nur innerhalb einer Familie, nicht aber zwischen verschiedenen Familien verglichen werden. Eine Angabe von Klongrößen in Bezug zur Gesamtpopulation ist so nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden expandierte CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellklone in den Läsionen gefunden. In beiden Fällen machten nur wenige Klone die Mehrheit der parenchymalen CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation aus. Hingegen bestand diese Population in allen

fünf untersuchten Läsionen zu nur 24-46% aus einem Hintergrund von polyklonalen Zellen. In Fall 1 war ein CD8<sup>+</sup> Klon besonders stark expandiert (Klon 1), er machte 35% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Unter den parenchymalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beider Fälle war der Anteil der klonal expandierten T-Zellen auffallend geringer. Hier konnte eine Mehrheit der Umlagerungen von 68-88% keinem in situ expandierten CD4<sup>+</sup> T-Zellklon zugeordnet werden.

Diese Ergebnisse sind mit denen der oben genannten Arbeiten - soweit vergleichbar - kompatibel. Die Arbeit von Wucherpfennig und Kollegen (1992) bemühte sich hierbei als einzige um eine Klassifizierung des Aktivitätszustands der untersuchten Läsionen, eine Klassifizierung, die allerdings im Lichte neuerer Arbeiten als unzureichend erscheint (Brück et al., 1995; Lucchinetti et al., 1996). In den v.a. auf der Basis von Hyperzellularität und Oil-Red-O-Färbung definierten aktiven Läsionen fand sich ein umfangreiches TCRV $\alpha$ - und V $\beta$ -Repertoire. Nach Meinung der Autoren finden sich bei Vergleich von Läsionen desselben Falls klare Unterschiede im TCR-Repertoire. Diese Unterschiede erscheinen jedoch nach Reevaluierung der veröffentlichten Daten zumindest für die aktiven Läsionen bestenfalls moderat. Da in der vorliegenden Analyse keine auffälligen Unterschiede zwischen den drei aktiven Läsionen von Fall 1 zu finden waren, sind die Ergebnisse beider Analysen vergleichbar. Die Arbeiten von Oksenberg und Kollegen (1990) sowie Birnbaum und Van Ness (1992) - beide ohne histopathologische Informationen - beschrieben eine begrenzte Heterogenität von TCRV $\alpha$  - (Oksenberg et al.) bzw. TCRV $\beta$ -Transkripten (Birnbaum und Van Ness) in MS-Hirnmateriale. Es ergaben sich Hinweise auf Überrepräsentationen von T-Zellen, die einige bestimmte TCRAV- oder TCRBV-Gensegmente benutzten. Als einzige der genannten Gruppen waren Birnbaum und Van Ness um Quantifizierung bemüht, indem sie die Daten aus den TCRBV-Familien-spezifischen RT-PCR-Reaktionen auf alle im Material vorhandenen T-Zellen normalisierten.

Zusammenfassend ist zu bemerken, daß die genannten Arbeiten das TCR-Repertoire des gesamten T-Zellinfiltrats, also in erster Linie das der zahlenmäßig dominierenden Fraktion der perivaskulären Zellen beschrieben. Die Daten aus diesen Arbeiten zusammengekommen könnten das Repertoire einer oligoklonalen, möglicherweise Antigen-selektierten T-Zellsubpopulation vor dem Hintergrund von polyklonalen T-Zellen widerspiegeln. Die Daten der vorliegenden Arbeit - erstmalig war eine Differenzierung zwischen perivaskulären und parenchymalen T-Zellen sowie verschiedenen T-Zell-Subpopulationen in aktiven Läsionen möglich - sind mit einer solchen Interpretation vereinbar (s. Abschnitt 4.1.5.).

#### ***4.1.4. Mögliche funktionelle Eigenschaften der in den MS-Läsionen expandierten T-Zellklone***

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnten an Immunantworten gegen Autoantigene des ZNS beteiligt sein und Oligodendrozyten durch direkte Lyse oder Sekretion von Zytokinen schädigen.

Das pathogene Potential von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifitäten für Myelinproteine ist für eine Vielzahl von Tiermodellen der MS allgemein anerkannt (Martin und McFarland, 1995; Miller et al., 1997; t'Hart et al., 2000; Wekerle et al., 1994). Nach Induktion von EAE in Nagern durch Immunisierung mit Hirnhomogenat oder Myelinproteinen werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifitäten für jene Epitope von (z.B.) MBP, PLP oder MOG aktiviert, welche in dem verwendeten Tierstamm encephalitogen sind. Immunisierung mit synthetischen encephalitogenen Peptiden (aus Myelinproteinsequenzen) oder Transfer von in vitro aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifitäten für Epitope von Myelinproteinen vermögen EAE ebenso auszulösen. Je nach Tierstamm, Immunisierungsstrategie oder verwendetem Myelinprotein unterscheiden sich die EAE-Modelle z.T. beträchtlich hinsichtlich der Krankheitsverläufe und der Pathologie. Letztere ist gekennzeichnet durch perivaskuläre Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen, Entzündung sowie (bisweilen nur geringgradige) Demyelinisierung. Die encephalitogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen lösen eine Überempfindlichkeitsreaktion des verzögerten Typs aus, indem sie proinflammatorische Cytokine, wie IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  sekretieren. IFN $\gamma$  führt u.a. zu einer erhöhten lokalen Expression von MHC-Molekülen der Klasse II, was mit einer verstärkten Präsentation von Myelinproteinen an CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen einhergeht, und aktiviert Makrophagen zur Freisetzung toxischer Substanzen. TNF $\alpha$  ist an der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und kann Oligodendrozyten direkt schädigen, was zum Myelinverlust führt (Brosnan und Raine, 1996; Martin und McFarland, 1995; Wekerle et al., 1994). CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielen ebenso in der EAE des Krallenaffen eine entscheidende Rolle (t'Hart et al., 2000). Einschränkend ist für die EAE zu bemerken, daß bei einer Krankheit, die durch Immunisierung mit einem extrazellulären Antigen induziert wird, von vornherein das Auslösen einer durch proinflammatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen getragenen Immunantwort gefördert wird. Dies legt die Vermutung nahe, daß die EAE nicht alle Aspekte der MS nachzustellen im Stande ist (Steinman, 2001; Vizler et al., 1999). Weiterhin gelten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der TMEV-induzierten Encephalomyelitis als krankheitsauslösend; Demyelinisierung ist hier in erster Linie die Konsequenz einer chronisch-entzündlichen Immunreaktion, die durch Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wird (s. Abschnitt 1.6.; [Miller et al., 1995; Miller et al., 1997; Strohlman und Hinton, 2001]).

Im Menschen legt die Assoziation von MS mit bestimmten MHC-Klasse-II-Haplotypen nahe, daß die Präsentation von Antigen zur Erkennung durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen pathogenetisch bedeutsam sein könnte (Dyment et al., 1997; Noseworthy, 1999). Wie in Abschnitt 1.8. erwähnt, ist die Frage nach unterschiedlichen Frequenzen von Myelin-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von MS-Patienten im Vergleich

zu normalen Spendern nicht zweifelsfrei zu beantworten. Als Hinweis auf eine pathogene Rolle von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in MS darf allerdings der Nachweis erhöhter Frequenzen von aktivierten Myelin-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten im Vergleich mit Blut dieser Patienten oder verglichen mit Zerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen gelten (Chou et al., 1992; Hafler und Weiner, 1995; Zhang et al., 1994). Um eine mögliche MHC Klasse II restringierte Präsentation von Myelinantigenen in MS-Läsionen direkt in situ untersuchen zu können, wurde kürzlich ein monoklonaler Antikörper mit Spezifität für den HLA-DRB1\*1501:MBP 85-99-Komplex generiert (Krogsgaard et al., 2000). Dieses MHC-Molekül gehört zu dem Haplotyp HLA-DR2, der mit MS assoziiert ist, während das MBP-Peptid aus der immundominanten Region des MBP stammt. Das Peptid ist für eine T-Zellerkennung, welche durch dieses MHC-Molekül restringiert wird, essentiell (Wucherpfennig et al., 1994). Dieser Antikörper markierte auf spezifische Weise Makrophagen, Mikroglia und vereinzelt hypertrophe Astrozyten in MS-Läsionen von Patienten ausschließlich mit dem Haplotyp HLA-DR2. Dies zeigt, daß HLA-DRB1\*1501:MBP 85-99-Komplexe in MS-Läsionen von Patienten dieses Haplotyps anwesend sind (Krogsgaard et al., 2000), womit die Grundvoraussetzung für eine Erkennung des Peptids MBP 85-99 durch autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in situ gegeben ist.

In den letzten Jahren wurde zunehmend der Frage nachgegangen, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei entzündlicher Myelinzerstörung (u.U. in Verbindung mit Schädigung von Neuronen) eine Rolle spielen können. Hinweise darauf ergaben sich bei der TMEV-induzierten Encephalomyelitis und bei der EAE (Steinman, 2001; Vizler et al., 1999). Obwohl CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der TMEV-induzierten Encephalomyelitis von entscheidender Bedeutung sind (s.o.), konnte gezeigt werden, daß auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Teil zur Gewebszerstörung beitragen (Murray et al., 1998b), insbesondere in späteren Phasen der Infektion (Strohlman und Hinton, 2001). CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine Verursacherrolle beim Auftreten funktioneller und neurophysiologischer Defizite zugewiesen werden. Trotz ausgeprägter Demyelinisierung zeigten MHC Klasse I defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen keinerlei neurologische Defizite; eine Beobachtung, die möglicherweise mit einem relativen Erhalt von Axonen sowie einer höheren Dichte von Natriumkanälen in den demyelinisierten Bereichen der Axone von MHC Klasse I defizienten Mäusen erklärt werden kann (Rivera-Quiñones et al., 1998). Eine andere Studie zeigte, daß für den Erhalt neurologischer Funktionen bereits eine Inhibierung der Immunreaktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifität für ein bestimmtes TMEV-Peptid ausreichend ist (Johnson et al., 2001). Mit dem Auftreten neurologischer Defizite wurde ein Perforin-abhängiger Effektormechanismus in Verbindung gebracht (Murray et al., 1998a).

Koh et al. schrieben CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Beitrag zur Gewebszerstörung in der EAE zu. So verläuft die akute Phase bei der durch MBP iduzierten EAE in CD8-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren weniger schwer, so daß die Erkrankung seltener

zum Tod der Tiere führt (Koh et al., 1992). Kürzlich wurden von zwei unabhängigen Gruppen neue EAE-Modelle beschrieben, bei denen Myelin-reaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Effektorzellen die Hauptrolle spielten (Huseby et al., 2001; Sun et al., 2001). Sun und Kollegen konnten zeigen, daß sich mit bestimmten MOG-Peptiden in der Maus eine hohe Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren läßt, die nach Isolierung und adoptivem Transfer in nicht-immunisierte Mäuse massive Entzündung und Demyelinisierung im ZNS auslösen. In der Arbeit von Huseby und Kollegen wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Spezifität für ein MBP-Epitop beschrieben, die in Mäusen eine schwere Autoimmunerkrankung des ZNS auslösten. Bei den Tieren traten klinische Symptome wie spastische Reflexe und Lähmung der Extremitäten sowie Gewichtsverlust und eine hohe Mortalitätsrate auf. Die Erkrankung war sowohl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit anderen Spezifitäten (als für das verwendete MBP-Peptid) unabhängig und konnte durch Neutralisierung von INF $\gamma$  weitgehend inhibiert werden. Die Pathologie zeigte Ähnlichkeiten zu MS, wie sie in der EAE, die durch Myelin-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierbar ist, bisher noch nicht beobachtet worden waren (Huseby et al., 2001). Beispielsweise führte die systemische Gabe von INF $\gamma$  in klinischen Studien mit MS-Patienten zu einer Verschlimmerung der Symptome (Panitch et al., 1987), während für systemisch verabreichtes INF $\gamma$  bei der durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzierten EAE eine protektive Wirkung nachgewiesen wurde (Krakowski und Owens, 1996).

Cytotoxische T-Zellen mit Spezifitäten für Myelinproteine wurden im Blut von MS-Patienten und gesunden Individuen nachgewiesen. Diese MBP- und MAG-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen können intrazellulär prozessierte Antigene erkennen und in vitro TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  produzieren (Jurewicz et al., 1998; Tsuchida et al., 1994). Von humanen Oligodendrozyten wurde gezeigt, daß sie in der Lage sind, MHC Klasse I-Moleküle in vitro auszuprägen (Grenier et al., 1989; Massa et al., 1993) und daß sie durch MBP-spezifische cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen lysierbar sind (Jurewicz et al., 1998). PLP-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können sowohl Matrix-Metalloproteinasen (Enzyme, die für die Migration von Zellen durch Bindegewebe und Basalmembranen wichtig sind) als auch proinflammatorische Chemokine (chemische Mediatoren, die eine Rolle bei der Wanderung und Aktivierung von Leukozyten spielen) sekretieren, wie z.B. die "Makrophagen-Entzündungsproteine" (MIP)-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ , IL-16 oder das "IFN-induzierbare Protein" (IP)-10 (Biddison et al., 1997). Zudem wurde gezeigt, daß diese, v.a. mit Hilfe des IP-10, Myelin-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen chemotaktisch anlocken können (Biddison et al., 1998).

Außer pathogenen autoreaktiven T-Zellen könnten MS-Läsionen auch regulatorische T-Zellklone enthalten, die die pathologische Immunantwort bremsen. In der EAE wurden Effekte von sowohl CD4<sup>+</sup> (Chen et al., 1995; Kumar et al., 1996; Olivares-Villagomez et al., 1998; Van de Keere und Tonegawa, 1998) als auch CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (Jiang et al., 2001; Jiang et al., 1992; Koh et al., 1992; Sun et al., 1988; Sun et al., 1999) beschrieben.

Es wurden Mäuse generiert, die für einen TCR mit Spezifität für ein MBP-Peptid transgen und gleichzeitig für das "Recombination-Activating Gene" (RAG)-1 defizient sind und deshalb außer den transgenen T-Zellen keine anderen Lymphozyten besitzen. Im Gegensatz zu TCR-transgenen Tieren mit funktionellem RAG-1-Gen erkrankten die RAG-1-defizienten zu 100% spontan an EAE (Lafaille et al., 1994). Später konnten diese protektiven Eigenschaften  $CD4^+$  T-Zellen zugeschrieben werden, die nur in den RAG-1-kompetenten, TCR-transgenen Mäusen in einer geringen Anzahl infolge endogener TCR-Genumlagerungen entstanden waren. Regulatorische  $CD4^+$  T-Zellen, welche nicht den transgenen TCR trugen, verhinderten demnach die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (Olivares-Villagomez et al., 1998; Van de Keere und Tonegawa, 1998). Weiterhin kann in Nagern durch Füttern von MBP die sogenannte "orale Toleranz" induziert werden. In diesen Tieren entstehen regulatorische MBP-spezifische  $CD4^+$  T-Zellen, die nach adoptivem Transfer in nicht-tolerisierte Empfängertiere in der Lage sind, diese (u.a.)  $TGF\beta$ -abhängig vor EAE zu schützen (Chen et al., 1995; Strobel und Mowat, 1998; Weiner, 2000).

Aus einer Studie mit  $CD8$ -defizienten Mäusen ging hervor, daß  $CD8^+$  T-Zellen bei der EAE höchstwahrscheinlich nicht nur als Effektorzellen am Krankheitsgeschehen teilhaben (s.o.), sondern auch regulatorische Funktionen ausüben. Die  $CD8$ -defizienten Mäuse zeigten nämlich im Vergleich zu Wildtypmäusen einen mehr chronischen Verlauf der EAE, mit einer größeren Zahl von Schüben (Koh et al., 1992). Eine andere Studie verwendete ein Immunisierungsprotokoll, das in Wildtypmäusen zu einer monophasischen EAE führt. Gegen die Induktion einer zweiten Krankheitsphase waren die Tiere resistent. Depletion von  $CD8^+$  T-Zellen durch monoklonale Antikörper hatte einen Verlust der Resistenz gegen die Induktion einer zweiten Phase zur Folge (Jiang et al., 1992). Es liegt nahe, eine direkte Zytolyse von encephalitogenen T-Zellen durch regulatorische  $CD8^+$  T-Zellen zu vermuten (Sun et al., 1988). In jüngeren Arbeiten wurden bei der Suche nach den Spezifitäten von regulatorischen  $CD8^+$  T-Zellen, die nach Vakzinierung mit MBP-spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen entstanden waren und bei der EAE protektiv wirkten, Spezifitäten für TCRBV8-Peptide erhalten. Dieses TCRBV-Segment wurde von den TCRV $\beta$ -Umlagerungen der in diesem Modell verwendeten encephalitogenen  $CD4^+$  T-Zellen benutzt (Jiang et al., 2001; Jiang et al., 1998). Diese Resultate stützen die Annahme einer direkten Zytolyse von encephalitogenen  $CD4^+BV8^+$  T-Zellen durch regulatorische  $CD8^+$  T-Zellen.

Außer autoreaktiven und regulatorischen T-Zellklonen könnten auch Klone in den Hirnläsionen anwesend sein, die primär nicht an autoreaktiven Prozessen beteiligt sind.

Aktiviert T-Zellen besitzen die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und zu Entzündungsherden zu migrieren, unabhängig davon, welche Antigenspezifität sie besitzen (Hickey et al., 1991; Wekerle et al., 1986). Klonal expandierte  $CD8^+$  T-Zellen wurden im Blut von MS-Patienten gefunden (Monteiro et al., 1996). Allerdings enthält die Population der aktivierten (vornehmlich  $CD8^+$ ) T-Zellen sogar in gesunden Indivi-

duen oft einen hohen Anteil klonal expandierter Zellen (Hingorani et al., 1993; Panettier et al., 1995; Posnett et al., 1994; Schwab et al., 1997). Diese können über Jahre hinweg stabil sein. Sie sind insbesondere im Blut älterer Individuen zu finden und könnten Ausdruck einer chronischen T-Zellreaktion bei persistierenden mikrobiellen Infektionen sein (Schwab et al., 1997). Eine Studie testete Läsionen von Patienten mit akuten oder chronisch entzündlichen Krankheiten auf die Anwesenheit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Reaktivität gegen Herpesviren, die in der Bevölkerung häufig anzutreffen sind (Scotet et al., 1999). Die Autoren fanden in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose, also Krankheiten mit (Arthritis) bzw. ohne (Arthrose) vermuteter autoimmuner Pathogenese, in vielen Fällen Anreicherungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die gegen Antigene des Epstein-Barr Virus (EBV) oder des humanen Cytomegalovirus reaktiv waren. Dies legt die Vermutung nahe, daß diese sich in unspezifischer Weise allein aufgrund ihres aktivierten Phänotyps an den Orten der Entzündung angesammelt hatten. Allerdings trat eine Infiltration der Synovien mit solchen T-Zellen v.a. in den chronischen Stadien der untersuchten Erkrankungen zutage (Scotet et al., 1999). Es ist also möglich, daß sich unter den in der vorliegenden Arbeit - hier allerdings in akut entzündlichen Läsionen - nachgewiesenen expandierten T-Zellklonen auch solche befanden, die mit der ursprünglichen Pathogenese nichts zu tun haben. Ein indirekter Beitrag zur Aufrechterhaltung der Entzündung durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach lokaler Antigenerkennung ist trotzdem denkbar (Scotet et al., 1999).

#### ***4.1.5. Die mögliche Bedeutung der Verteilungsmuster klonal expandierter T-Zellen in den Läsionen***

Wie in Abschnitt 1.8. erwähnt, kamen Studien, die sich mit dem T-Zellrepertoire in erkranktem ZNS-Gewebe bei EAE befaßten, je nach verwendetem Tiermodell bzw. Immunisierungsprotokoll zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige Studien fanden bei der durch MBP- oder PLP-Peptide induzierten EAE der Maus eine Dominanz von polyklonalen TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen in den Läsionen (Bell et al., 1993; Kuchroo et al., 1992; Sobel und Kuchroo, 1992). Zwei Studien analysierten die Verteilung encephalitogener T-Zellen in ZNS-Läsionen in der Lewis-Ratte (Lannes-Vieira et al., 1994; Tsuchida et al., 1993). Die Induktion von EAE erfolgte entweder durch Transfer einer MBP-spezifischen TCRBV8.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie oder durch Immunisierung mit MBP (encephalitogene T-Zellen benutzen in diesem EAE-Modell fast ausschließlich das BV8.2<sup>+</sup> Segment [Gold et al., 1991]). In beiden Studien fand sich unter den parenchymalen T-Zellen eine Anreicherung von BV8.2<sup>+</sup> Zellen. Unter den perivaskulären T-Zellen hatten BV8.2<sup>+</sup> Zellen hingegen nur einen geringen Anteil; ein Anteil, der die geringe Häufigkeit von BV8.2<sup>+</sup> Zellen im normalen T-Zellrepertoire widerspiegelt. Diese Ergebnisse wurden kürzlich bestätigt. Hier wurde EAE in Ratten durch Transfer einer MBP-spezifischen T-Zelllinie, welche das "grün-fluoreszierende Protein" aus-

prägte, ausgelöst. Bei Beginn der klinischen Symptomatik waren bis zu 90% der in das ZNS infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen grün fluoreszierend, auf dem Höhepunkt noch immer etwa ein Drittel. Die meisten davon fanden sich im Parenchym (Flügel et al., 2001; Flügel et al., 1999).

So wäre es auch für die MS vorstellbar, daß die parenchymalen T-Zellen sich hinsichtlich TCR-Repertoire und Funktion beträchtlich von den T-Zellen der perivaskulären Infiltrate unterscheiden. Möglicherweise findet sich ein Großteil der klonal expandierten, encephalitogenen T-Zellen im Parenchym, während der größte Anteil des perivaskulären Infiltrats aus polyklonalen, unspezifisch angelockten T-Lymphozyten besteht. Die in der vorliegenden Studie aus dem Vergleich der klonalen Zusammensetzung von parenchymalen vs. perivaskulären T-Zellen erhaltenen Ergebnisse lassen eine solche Interpretation zu, jedoch ist die Situation bei den beiden untersuchten MS-Patienten weniger eindeutig als bei den geschilderten Ratten-Experimenten. Die Mehrheit der parenchymalen T-Zellen war (zumeist CD8<sup>+</sup>) T-Zellklonen zuzuordnen, während dies nur für eine Minderheit der perivaskulären T-Zellen zutrif. Allerdings waren die parenchymalen T-Zellen - insbesondere in Fall 2 - oligo- statt monoklonal expandiert und Vertreter der meisten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Klone waren in beiden Bereichen zu finden.

Wie die Experimente in der Maus andeuten, scheint also eine Fraktion von unspezifisch zum Ort der Entzündung gelockten (vornehmlich in den perivaskulären Regionen lokalisierten) T-Zellen vorhanden zu sein. Die (v.a. im Parenchym) vorherrschende Oligoklonalität könnte, in Abgrenzung zu der einfacheren Situation in den Ratten-Experimenten, wo die Krankheit durch eine weitgehend monoklonale T-Zellreaktion akut ausgelöst wird, mit dem Phänomen des "Determinant Spreading" erklärt werden (Lehmann et al., 1993). So wäre es vorstellbar, daß die spezifische Immunreaktion in den untersuchten MS-Läsionen einen Diversifizierungsprozeß erfahren hat, in dessen Verlauf auch T-Zellen mit anderen Spezifitäten als die, die unmittelbar zu Beginn der Krankheit maßgeblich waren, in das Krankheitsgeschehen eingreifen. Dieses Phänomen ist nicht nur aus Tiermodellen bekannt (Lehmann et al., 1992; Miller et al., 1997), sondern kommt wahrscheinlich auch in der MS zum Tragen (Goebels et al., 2000; Tuohy et al., 1999).

Ein Vergleich der klonalen Zusammensetzung des CD8<sup>+</sup> T-Zellinfiltrats einer aktiven vs. einer inaktiven Läsion ergab keine klaren Unterschiede, außer, daß sich der CD8<sup>+</sup> Klon 1 in Fall 1 zweimal häufiger in der inaktiven Läsion fand. Bei diesem könnte es sich um einen suppressiv wirkenden Klon handeln, der für das Herunterregeln der demyelinisierenden Aktivität in der inaktiven Läsion verantwortlich war (s. Abschnitt 4.1.4.). Alternativ wäre ein von Steinman und Kollegen vorgeschlagenes Konzept vorstellbar, nach dem die pathogenetisch relevanten T-Zellen häufiger in inaktiven Läsionen zu finden sind, da sie dort weniger stark durch unspezifisch angelockte T-Zellen "verdünnt" werden (Brocke et al., 1996; Karin et al., 1993; Steinman, 1996a).

#### ***4.1.6. Die Hinweise für die Selektion einiger CD8<sup>+</sup> T-Zellen für gemeinsame Antigen-spezifitäten***

Die V-Regionen der TCR $\beta$ -Ketten einiger CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz (s. Abschnitt 3.1.6.), was auf eine Selektion für gemeinsame Peptidspezifitäten hinweist. So waren die TCR $\beta$ -Ketten des Klons 7 und einer nur einmal isolierten Zelle auf Aminosäureebene absolut identisch, obwohl mehrere Unterschiede in den Nukleotidsequenzen beide als nicht klonal verwandt auswiesen. Argaet und Kollegen isolierten aus einem Patienten zwei CD8<sup>+</sup> Klone, die beide gegen denselben (Virus-) Peptid:MHC-Komplex reaktiv waren und deren TCR $\beta$ -Ketten die gleiche Aminosäuresequenz, jedoch unterschiedliche Nukleotidsequenzen aufwiesen (Argaet et al., 1994). Darüberhinaus kam in den TCR $\beta$ -V-Regionen der CD4<sup>+</sup> Zellen das BJ-Segment BJ1S1 besonders häufig vor. Es ist bekannt, daß TCR mit Spezifitäten für bestimmte Epitope einzelne Gensegmente bevorzugt verwenden (Casanova und Maryanski, 1993; Matis, 1990). Schließlich fand sich ein gleichlautendes, vier Aminosäuren langes Motiv in den CDR3-Regionen der CD8<sup>+</sup> Klone 9 aus Fall 1 und 8 aus Fall 2. Klon 9 stellt nach Einbeziehung der 5'-RACE-Daten (s. Abschnitt 3.3.2.) in Fall 1 den zweitgrößten Klon dar, Klon 8 in Fall 2 den drittgrößten. Zudem wurde letzterer im Blut des Patienten 2 entdeckt (s. Abschnitt 3.2.2.), was eventuell seine Isolierung erlaubt.

Daß diese Zellen aktiv am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, ist eine naheliegende Annahme. Daß sie es nicht sind, sondern stattdessen für Antigene, die keine Relevanz für die MS-Pathogenese haben, selektiert worden waren und unspezifisch eingewandert sind, ist eine alternative Erklärung (Argaet et al., 1994; Scotet et al., 1999).

#### **4.2. Die Detektion zweier im Hirnmaterial von Fall 2 identifizierter T-Zellklone im peripheren Blut des Patienten und der Versuch ihrer Isolierung**

Zwei unterschiedliche Techniken wurden eingesetzt, um in situ identifizierte T-Zellklone in Blutproben des Patienten 2, welche 12 und 31 Monate nach der Hirnbiopsie gewonnen worden waren, nachzuweisen. Ziel ist, nach erfolgreicher Detektion der Klone diese aus dem Blut zu isolieren, um in vitro ihre Antigen-spezifitäten bestimmen zu können. Der Nachweis des CD8<sup>+</sup> Klons 10 gelang in beiden Blutproben mit Hilfe der "CDR3-Spektratyping"-Technik (s. Abschnitt 3.2.1.). Auch wurde der CD8<sup>+</sup> Klons 8 mittels sensitiver klonspezifischer PCR in beiden Blutproben gefunden (s. Abschnitt 3.2.2.). Die Häufigkeiten der beiden Klone bewegten sich mit 1 in 10<sup>3</sup> CD8<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen etwa in der gleichen Größenordnung (CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> [Gedächtnis-] T-Zellen machten bei diesem Patienten knapp die Hälfte aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus; nicht gezeigt).

Aus der Tatsache, daß gerade diese beiden Klone nachzuweisen waren, eine Antwort auf die Frage nach ihrer Relevanz für die MS-Pathogenese abzuleiten, ist nicht möglich. Goebels et al. (2000) verfolgten die Persistenz MBP-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellklone im Blut einiger Individuen über mehrere Jahre hinweg. Den Autoren war es möglich, bestimmte Klone nachzuweisen, indem sie diese *in vitro* durch Stimulation mit MBP expandierten und ihre TCR $\beta$ -V-Regionsequenzen anschließend sequenzierten. Der Nachweis gelang selbst zu Zeiten klinischer Remission. Jedoch war keiner von ihnen mit Hilfe des "CDR3-Spektratypings" nachweisbar. Die Autoren schlossen daraus, daß die Häufigkeit dieser CD4<sup>+</sup> Klone in T-Zellen des Bluts geringer als 1 in  $5 \times 10^3$  (Sensitivitätsgrenze der Technik) gewesen sein mußte (Goebels et al., 2000). Von CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen ist allerdings bekannt, daß persistierende Klone zumeist größer sind als solche der CD4<sup>+</sup> Subpopulation (Maini et al., 1999). Daß die Klone 8 und 10 nicht autoreaktiv sind, stattdessen aber Antigenspezifitäten für persistierende Pathogene besitzen, von welchen sie unablässig stimuliert werden, ist eine Alternativerklärung. Häufigkeiten EBV-spezifischer T-Zellen von 1 in  $2 \times 10^3$  PBMCs wurden beschrieben (Burrows et al., 1995).

Ein erster Versuch, beide Klone ausgehend von insgesamt  $2,5 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* zu expandieren und anschließend mittels Grenzverdünnung zu klonieren, war nicht erfolgreich (s. Abschnitt 3.2.3.). Die Expansion war für Klon 8 durch Stimulation mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern, für BV14<sup>+</sup> Klon 10 mit anti-BV14- und anti-CD28-Antikörpern erfolgt. Für die Expansion von Klon 10 wurde ein starker Anreicherungseffekt erwartet, denn unter diesen Kulturbedingungen überleben nur BV14<sup>+</sup> T-Zellen (Maccalli et al., 1997). Dennoch war keiner der beiden Klone nach der Expansionskultur mittels sensitiver klonspezifischer PCR nachweisbar. Es stellt sich die Frage, ob die spezifische Amplifikation der Genumlagerungen von Klon 8 und Klon 10 unzulänglich war. Beide Detektionsmethoden funktionierten erwiesenermaßen bis zu einer Sensitivität von etwa 1 in  $10^3$  T-Zellen (s. Abschnitt 2.11.). Wegen der äußerst geringen Mengen an Ausgangsmaterial mußte auf die Gewinnung von genomischer DNA und somit auf klonspezifische PCR vor Beginn der Expansionskultur verzichtet werden. Dieses wichtige Kontrollexperiment ist für die Klärung der Frage unverzichtbar, ob zu Beginn der Expansionskultur vorhandene Mitglieder der beiden Klone während der Kultur verloren gegangen sind. Für die Annahme, daß sich bestimmte Klonotypen mit dieser Technik schlechter expandieren lassen als andere, gibt es Hinweise (Maccalli et al., 1997). Es wurde außerdem beschrieben, daß verschiedene T-Zellsubpopulationen in Bezug auf Kryopräservierung unterschiedlich empfindlich sein können, beispielsweise bei Anwendung einer Standardmethode (ähnlich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten [Strauss, 1991]). Sollten die beiden Klone gerade besonders sensitiven T-Zellpopulationen angehören, so ist vorstellbar, daß gerade sie die Kryopräservierung nicht überlebt hatten. Eine Alternativerklärung ist, daß diese Klone nicht reaktivierbar sind, da sie zwar *in vivo* persistiert, jedoch einen nicht-responsiven Phänotyp angenommen hatten (Welsh, 2001; Zajac et al., 1998). Um in zukünftigen Experimenten mit

größeren Zellzahlen beginnen zu können, könnte - als Alternative zu den geringen Restmengen der Blutproben "12" und "31 mo" - auf Blut zurückgegriffen werden, das 41 Monate nach der Hirnoperation gewonnen wurde. Auch könnte frisch gewonnenes Blut eingesetzt werden. Weiterhin könnte auf die Expansionskultur verzichtet und die gewünschten Zellen nach bestmöglicher Anreicherung per FACS sofort mittels Grenzverdünnung kloniert werden.

### **4.3. Etablierung und Anwendung einer 5'-RACE-Technik zur Identifizierung möglicher Rezeptorkettenpaare für T-Zellklone der MS-Fälle 1 und 2**

Um die Antigenspezifitäten von in situ expandierten Klonen aus beiden Fällen aufklären zu können (für Fall 1 stand kein Blut zur Verfügung), war ein Ansatz notwendig, mit dem eine Koamplifikation von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Genumlagerungen aus einzelnen mikromanipulierten Zellen möglich ist.

Für den ersten von insgesamt zwei Schritten mußte eine Technik zur Amplifikation von TCR $\alpha$ -Genumlagerungen zur Verfügung stehen, mit deren Hilfe sich für die (anhand ihrer TCR $\beta$ -Umlagerungen identifizierten) T-Zellklone die möglichen TCR $\alpha$ -Partnerketten identifizieren lassen. Daher wurde eine 5'-RACE-Technik etabliert, mit der dies auf Einzelzellniveau möglich ist (s. Abschnitt 3.3.1.). Hierbei wird über den "Template-Switching"-Effekt der Einbau einer definierten (universellen) Sequenz in das zu amplifizierende cDNA-Molekül katalysiert. Daher kann eine Amplifikation beider TCR-V-Regionsequenzen unter Verwendung von ausschließlich TCRAC- bzw. TCRBC-spezifischen Primern sowie eines Universalprimers erfolgen. Die PCR-Produkte können direkt sequenziert werden. In einem zweiten Schritt, der in Abschnitt 4.4. erläutert ist, muß verifiziert werden, ob mögliche TCR $\alpha/\beta$ -Kettenpaare auch tatsächlich von den in situ expandierten T-Zellklonen ausgeprägt wurden.

Mit dieser Technik gelang eine Koamplifikation beider TCR-Umlagerungen zu 80% bei Proben, die 10 mittels FACS sortierte T-Zellen enthielten, sowie zu 14% bei Proben mit einer einzigen sortierten T-Zelle. Bei mikromanipulierten T-Zell-reichen, etwa drei Zellen enthaltenden Proben aus einer Tonsille war dies zwar nur zu 7% möglich, jedoch waren hier 25% für zumindest eine der beiden TCR-Umlagerungen positiv. Also sollten sich aus Proben des Hirnmaterials, welche eine oder wenige T-Zellen enthalten, TCR $\alpha$ -Umlagerungen identifizieren lassen, die als Kandidaten- $\alpha$ -Ketten gerade für die größeren T-Zellklone gelten können. Die 5'-RACE-Analyse des MS-Materials lieferte bisher für Fall 1 sechs und für Fall 2 11 solcher TCR $\alpha$ -Umlagerungen, insgesamt neunmal wurden  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -V-Regionen aus derselben Probe erhalten.

Die aus der 5'-RACE-Analyse erhaltenen TCR $\beta$ -Umlagerungen bestätigen die in Abschnitt 4.1.2. festgestellte Verlässlichkeit der TCR $\beta$ -PCR auf genomischer DNA. Sie zeigen insbesondere, daß von größeren, im Hirnmaterial beider Fälle anwesenden T-Zellklonen höchstwahrscheinlich keiner in der Repertoireanalyse übersehen worden

war. Von den für Fall 2 erhaltenen neun TCR $\beta$ -Umlagerungen waren nämlich sieben bereits in der Repertoireanalyse erhalten worden; sie konnten also expandierten T-Zellklonen zugeordnet werden. Von den acht für Fall 1 in der 5'-RACE-Analyse amplifizierten traf dies zwar nur für drei TCR $\beta$ -V-Regionen zu, allerdings wurden die meisten Proben aus Läsion 2 gewonnen, in der nur etwa die Hälfte der CD8<sup>+</sup> Zellen T-Zellklonen zuzuordnen war (eine kleine Fraktion der anwesenden T-Zellen gehörte zudem der heterogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation an). Weiterhin waren sämtliche TCRBV- und TCRBJ-Segmente, die in den neu erhaltenen TCR $\beta$ -V-Regionen umgelagert waren, bereits in der Repertoireanalyse mehr als einmal aufgetaucht, d.h. diese Umlagerungen wären prinzipiell auch durch die TCR $\beta$ -PCR auf genomischer DNA amplifizierbar.

Insgesamt ist anzumerken, daß mit der 5'-RACE-Technik zwar auch nicht informative Keimbahntranskripte amplifiziert werden (s. Legende zur Tabelle VII), trotzdem war sie eine entscheidende Hilfe bei der Suche nach möglichen TCR $\alpha$ -Umlagerungen für in situ identifizierte T-Zellklone. Im Vergleich zu einer RT-PCR auf Einzelzellniveau ohne Nutzung des "Template-Switching"-Effekts entfiel die Notwendigkeit, Primer für 42 TCRAV-Segmente zum Einsatz in einem einzigen Reaktionsansatz etablieren zu müssen. Für den Alternativansatz einer TCR $\alpha$ -Einzelzell-PCR auf chromosomaler DNA wären gar Primer für 42 TCRAV- und 61 TCRAJ-Segmente zu etablieren gewesen. Zudem ist die RT-PCR von sehr kurzen mRNA-Molekülen ( $\geq 200$  Bp) möglich, von Molekülen, die durch Fragmentierung in situ entstehen und durch eine RT-PCR-Technik, welche auf TCRAV/BV-Primermixen basiert, evtl. nicht amplifizierbar gewesen wären, da sie ihre Primer-Bindestellen im V-Segment verloren hätten.

#### 4.4. Weiterführende Experimente und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden expandierte T-Zellklone in aktiv demyelinisierenden Läsionen zweier MS-Fälle identifiziert. Für die Beantwortung der Frage nach ihrer Bedeutung für die MS-Pathogenese ist es von grundlegender Wichtigkeit, ihre Antigen-spezifitäten zu kennen. Zukünftige Experimente haben die in-vitro-Analyse dieser Spezifitäten zum Ziel. Nachdem es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich war, für einige der anhand ihrer TCR $\beta$ -Umlagerungen identifizierten Klone mögliche TCR $\alpha$ -Partnerketten zu identifizieren, soll in einem nächsten Schritt verifiziert werden, daß die gefundenen Paare von Genumlagerungen tatsächlich demselben Klon zuzuordnen sind. Dies soll geschehen, indem die gesamte genomische DNA einzelner mikro-manipulierter T-Zellen durch unspezifische Voramplifikation ("Whole-Genome-Preamplification") zunächst vervielfältigt wird (Zhang et al., 1992b), um anschließend beide TCR-Umlagerungen unter Verwendung der passenden V/J-Primerpaare zu amplifizieren. Nach "Whole-Genome-Preamplification" einer Einzelzelle mehrfach zur Verfügung stehende Kopien des TCR $\alpha$ -Locus lassen nicht nur einen Check verschie-

dener Kandidaten- $\alpha$ -Ketten zu, sondern erlauben auch den Nachweis einer möglicherweise in der analysierten Zelle vorhandenen zweiten funktionellen TCR $\alpha$ -Umlagerung. Es wird nämlich vermutet, daß ein Teil der TCR $\alpha\beta^+$  Zellen zwei TCR ausprägt; TCR, die jeweils dieselbe  $\beta$ -Kette, jedoch eine andere  $\alpha$ -Kette verwenden (Padovan et al., 1993). Die klonalen TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Kettensequenzen sollen dann in Expressionsvektoren kloniert und in einer TCR-defizienten T-Zelllinie (z.B. 58  $\alpha\beta^-$ , Dres. B. Malissen, K. Dornmair; persönliches Gespräch) ausgeprägt werden. Die eigentliche Spezifitätsbestimmung könnte unter Verwendung von B-lymphoblastoiden Zelllinien als Antigen präsentierende Zellen und Peptidbibliotheken (z.B. "Soluble Combinatorial Peptide Libraries in the Positional Scanning Format" [PS-SCL; Hemmer et al., 1999]) erfolgen. Solche B-lymphoblastoide Zelllinien sind für Fall 2 bereits vorhanden, für Fall 1 jedoch nicht, da von der Patientin keine Blutprobe zur Verfügung stand. Zur Zeit wird in Blutbanken nach möglichen histokompatiblen Blutspendern gesucht. Aus Blutproben dieser Individuen könnten B-lymphoblastoide Zelllinien durch Transformation mit EBV generiert werden (Lefkovits, 1997). Sollten geeignete Individuen nicht auffindbar sein, könnten die Gene der HLA-Allele der Patientin zur Herstellung Antigen präsentierender Zellen alternativ in nicht-lymphoiden Zelllinien ausgeprägt werden (z.B. nach der von Scotet et al. [1999] beschriebenen Methode des "transienten COS Transfektions-Assays").

In vivo dominante T-Zellklone könnten das Ziel einer selektiven Immuntherapie sein (Hohlfeld, 1997; Martin et al., 2001; Noseworthy, 1999; Steinman, 1996b). Ob man versuchen würde, diese Klone durch Deletion bzw. Tolerisierung selektiv auszuschalten, oder sie im Gegenteil in ihren Effektorfunktionen zu unterstützen, wird fundamental davon abhängen, ob man sich über ihre destruktive oder protektive Rolle im Klaren ist. Kenntnis der Zielstrukturen der am Krankheitsgeschehen beteiligten T-Zellen ist dafür unabdingbare Voraussetzung.

Sollte sich (wie erwartet) bestätigen lassen, daß sich mit der Kombination von 5'-RACE und "Whole-Genome-Pre-amplification" TCRs von klonal expandierten T-Zellen in situ identifizieren lassen, so ist eine Anwendung dieses Ansatzes in anderen Krankheiten mit ähnlicher Fragestellung und Histopathologie vorstellbar. Als Beispiele seien die Autoimmunkrankheiten juveniler Diabetes und rheumatoide Arthritis, außerdem Tumoren mit infiltrierenden CD8<sup>+</sup> Zellen genannt. Für zukünftige Experimente wäre eine Kombination der 5'-RACE-Technik mit der Immunhistochemie wünschenswert, um die zu analysierenden Zellen nach Färbung von spezifischen Oberflächenmarkern direkt ansprechen zu können (Fink et al., 2000).

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Allegretta, M., Nicklas, J. A., Sriram, S. und Albertini, R. J. (1990). T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247, 718-721.
- Anderson, A. C., Nicholson, L. B., Legge, K. L., Turchin, V., Zaghouani, H. und Kuchroo, V. K. (2000). High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naïve mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J. Exp. Med.* 191, 761-770.
- Anderton, S., Burkhart, C., Metzler, B. und Wraith, D. (1999). Mechanisms of central and peripheral T-cell tolerance: lessons from experimental models of multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 169, 123-137.
- Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D. und Mak, T. W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455-500.
- Argaet, V. P., Schmidt, C. W., Burrows, S. R., Silins, S. L., Kurilla, M. G., Doolan, D. L., Suhrbier, A., Moss, D. J., Kieff, E., Sculley, T. B. und Misko, I. S. (1994). Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 180, 2335-2340.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K., Hrsg. (1997). *Current protocols in molecular biology*. (N.Y.: John Wiley & Sons, Inc.).
- Bell, R. B., Lindsey, J. W., Sobel, R. A., Hodgkinson, S. und Steinman, L. (1993). Diverse T cell receptor Vbeta gene usage in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 150, 4085-4092.
- Ben-Nun, A., Wekerle, H. und Cohen, I. R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 11, 195-199.
- Benoist, C. und Mathis, D. (2001). Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nature Immunol.* 2, 797-801.
- Benoist, C. und Mathis, D. (1998). The pathogen connection. *Nature* 394, 227-228.
- Biddison, W. E., Cruikshank, W. W., Center, D. M., Pelfrey, C. M., Taub, D. D. und Turner, R. V. (1998). CD8<sup>+</sup> myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4<sup>+</sup> myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10. *J. Immunol.* 160, 444-448.
- Biddison, W. E., Taub, D. D., Cruikshank, W. W., Center, D. M., Connor, E. W. und Honma, K. (1997). Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8<sup>+</sup> T cells: potential roles in inflammation. *J. Immunol.* 158, 3046-3053.
- Bieganowska, K. D., Ausubel, L. J., Modabber, Y., Slovik, E., Messersmith, W. und Hafler, D. A. (1997). Direct ex vivo analysis of activated, fas-sensitive autoreactive T cells in human autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 185, 1585-1594.
- Birnbaum, G. und van Ness, B. (1992). Quantitation of T-cell receptor V beta chain expression on lymphocytes from blood, brain, and spinal fluid in patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Ann. Neurol.* 32, 24-30.

- Booss, J., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W. und Mason, D. Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 62, 219-232.
- Brocke, S., Gijbels, K., Allegretta, M., Ferber, I., Piercy, C., Blankenstein, T., Martin, R., Utz, U., Karin, N., Mitchell, D., Veromaa, T., Waisman, A., Gaur, A., Conlon, P., Ling, N., Fairchild, P. J., Wraith, D. C., O'Garra, A., Fathman, C. G. und Steinman, L. (1996). Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature.* 379, 343-346; Published erratum appears in *Nature* 1998 Apr 9;392 (6676):630.
- Brosnan, C. F. und Raine, C. S. (1996). Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain. Pathol.* 6, 243-257.
- Brück, W., Porada, P., Poser, S., Rieckmann, P., Hanefeld, F., Kretzschmar, H. A. und Lassmann, H. (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 38, 788-796.
- Brück, W., Schmied, M., Suchanek, G., Bruck, Y., Breitschopf, H., Poser, S., Piddlesden, S. und Lassmann, H. (1994). Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 35, 65-73.
- Burrows, S. R., Silins, S. L., Moss, D. J., Khanna, R., Misko, I. S. und Argaet, V. P. (1995). T cell receptor repertoire for a viral epitope in humans is diversified by tolerance to a background major histocompatibility complex antigen. *J. Exp. Med.* 182, 1703-1715.
- Casanova, J.-L. und Maryanski, J. L. (1993). Antigen-selected T cell receptor diversity and self-nonsel homology. *Immunol. Today* 14, 391-394.
- Chen, Y., Inobe, J. und Weiner, H. L. (1995). Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells mediate active suppression. *J. Immunol.* 155, 910-916.
- Chou, Y. K., Bourdette, D. N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R. Y., Hashim, G. A. und Vandenberg, A. A. (1992). Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 38, 105-113.
- Cochet, M., Pannetier, C., Regnault, A., Darche, S., Leclerc, C. und Kourilsky, P. (1992). Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur. J. Immunol.* 22, 2639-2647.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. und Strober, W., Hrsg. (1994). *Current protocols in immunology.* (N.Y.: John Wiley & Sons, Inc.).
- Davis, M. M. und Bjorkman, P. J. (1988). T cell antigen receptor genes and T cell recognition. *Nature* 334, 395-402.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M. und Swain, S. L. (1998). T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 201-223.
- Dyment, D. A., Sadnovich, A. D. und Ebers, G. C. (1997). Genetics of multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1693-1698.

- Evans, C. F., Horwitz, M. S., Hobbs, M. V. und Oldstone, M. B. (1996). Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 184, 2371-2384.
- Ffrench-Constant, C. (1994). Pathogenesis of multiple sclerosis. *Lancet* 343, 271-275.
- Fink, L., Kinfe, T., Stein, M. M., Ermert, L., Hänze, J., Kummer, W., Seeger, W. und Bohle, R. M. (2000). Immunostaining and laser-assisted cell picking for mRNA analysis. *Lab. Invest.* 80, 327-333.
- Flügel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D. E., Li, Z., Ellwart, J. W., Willem, M., Lassmann, H. und Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 14, 547-560.
- Flügel, A., Willem, M., Berkowicz, T. und Wekerle, H. (1999). Gene transfer into CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: Green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses. *Nat. Med.* 5, 843-847.
- Fujinami, R. S. und Oldstone, M. B. A. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045.
- Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (2000). Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: Epitope spreading versus clonal persistence. *Brain*. 123, 508-518.
- Gold, D. P., Offner, H., Sun, D., Wiley, S., Vandenbark, A. A. und Wilson, D. B. (1991). Analysis of T cell receptor beta chains in Lewis rats with experimental allergic encephalomyelitis: conserved complementarity determining region 3. *J. Exp. Med.* 174, 1467-1476.
- Goldrath, A. W. und Bevan, M. J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 402, 255-262.
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L. P., Hood, L. und Zaller, D. M. (1993). Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell* 72, 551-560.
- Grenier, Y., Ruijs, T. C., Robitaille, Y., Olivier, A. und Antel, J. P. (1989). Immunohistochemical studies of adult human glial cells. *J. Neuroimmunol.* 21, 103-115.
- Hafler, D. A., Duby, A. D., Lee, S. J., Benjamin, D., Seidman, J. G. und Weiner, H. L. (1988). Oligoclonal T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 167, 1313-1322.
- Hafler, D. A. und Weiner, H. L. (1995). Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol. Rev.* 144, 75-107.
- Hall, M. A. und Lanchbury, J. S. (1995). Healthy human T-cell receptor beta-chain repertoire. Quantitative analysis and evidence for J beta-related effects on CDR3 structure and diversity. *Hum. Immunol.* 43, 207-218.
- Hauser, S. L., Bhan, A. K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C. und Weiner, H. L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 19, 578-587.

- Hayashi, T., Morimoto, C., Burks, J. S., Kerr, C. und Hauser, S. L. (1988). Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann. Neurol.* 24, 523-531.
- Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S. E., McFarland, H. F., Houghten, R., Simon, R., Pinilla, C. und Martin, R. (1999). Identification of candidate T cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat. Med.* 5, 1375-1382.
- Hickey, W. F., Hsu, B. L. und Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 254-260.
- Hingorani, R., Choi, I. H., Akolkar, P., Gulwani-Akolkar, B., Pergolizzi, R., Silver, J. und Gregeresen, P. K. (1993). Clonal predominance of T cell receptors within the CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> subset in normal human subjects. *J. Immunol.* 151, 5762-5769.
- Hofman, F. M., von Hanwehr, R. I., Dinarello, C. A., Mizel, S. B., Hinton, D. und Merrill, J. E. (1986). Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J. Immunol.* 136, 3239-3245.
- Hohlfeld, R. (1997). Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. *Brain.* 120, 865-916.
- Horwitz, M. S., Bradley, L. M., Harbertson, J., Krahl, T., Lee, J. und Sarvetnick, N. (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.* 4, 781-785.
- Huseby, E. S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Öhlén, C. und Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8<sup>+</sup> T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 669-676.
- Jiang, H., Braunstein, N. S., Yu, B., Winchester, R. und Chess, L. (2001). CD8<sup>+</sup> T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4<sup>+</sup> T cells in EAE mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 6301-6306.
- Jiang, H., Kashleva, H., Xu, L. X., Forman, J., Flaherty, L., Pernis, B., Braunstein, N. S. und Chess, L. (1998). T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4533-4537.
- Jiang, H., Zhang, S. I. und Pernis, B. (1992). Role of CD8<sup>+</sup> T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science.* 256, 1213-1215.
- Johnson, A. J., Upshaw, J., Pavelko, K. D., Rodriguez, M. und Pease, L. R. (2001). Preservation of motor function by inhibition of CD8<sup>+</sup> virus peptide-specific T cells in Theiler's virus infection. *FASEB J.* Express article 10.1096/fj.01-0373fje., Published online October 15, 2001.
- Jurewicz, A., Biddison, W. E. und Antel, J. P. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* 160, 3056-3059.

- Karin, N., Szafer, F., Mitchell, D., Gold, D. P. und Steinman, L. (1993). Selective and nonselective stages in homing of T lymphocytes to the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 150, 4116-4124.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A. und Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* 6, 56-61.
- Koh, D. R., Fung-Leung, W. P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H. und Mak, T. W. (1992). Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8<sup>-/-</sup> mice. *Science.* 256, 1210-1213.
- Krakowski, M. und Owens, T. (1996). Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 26, 1641-1646.
- Krogsgaard, M., Wucherpfennig, K. W., Canella, B., Hansen, B. E., Svejgaard, A., Pyrdol, J., Ditzel, H., Raine, C., Engberg, J. und Fugger, L. (2000). Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J. Exp. Med.* 191, 1395-1412.
- Kuchroo, V. K., Sobel, R. A., Laning, J. C., Martin, C. A., Greenfield, E., Dorf, M. E. und Lees, M. B. (1992). Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. *J. Immunol.* 148, 3776-3782.
- Kumar, V., Stellrecht, K. und Sercarz, E. (1996). Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Exp. Med.* 184, 1609-1617.
- Küppers, R. (1995). Analyse der B-Zell Differenzierung in menschlichen Keimzentren und der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen des Morbus Hodgkin mittels Mikromanipulation und Einzelzell-PCR. *Inaugural-Dissertation.*, Math.-Naturwiss. Fakultät der Universität zu Köln.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L. und Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 12, 4955-4967.
- Kurtzke, J. F. (1983). Epidemiology of MS. In Multiple Sclerosis, J. F. Hallpike, C. W. M. Adams und W. E. Tourtellote, Hrsg. (Baltimore, Maryland: Willimas and Wilkins), pp. 49-95.
- Lafaille, J. J., Nagashima, K., Katsuki, M. und Tonegawa, S. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78, 399-408.
- Lannes-Vieira, J., Gehrmann, J., Kreutzberg, G. W. und Wekerle, H. (1994). The inflammatory lesion of T cell line transferred experimental autoimmune encephalomyelitis of the Lewis rat: distinct nature of parenchymal and perivascular infiltrates. *Acta Neuropathol.* 87, 435-442.
- Lassmann, H., Raine, C. S., Antel, J. und Prineas, J. W. (1998). Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J. Neuroimmunol.* 86, 213-217.

- Lee, S. J., Wucherpfennig, K. W., Brod, S. A., Benjamin, D., Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1991). Common T-cell receptor V beta usage in oligoclonal T lymphocytes derived from cerebrospinal fluid and blood of patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 29, 33-40.
- Lefkovits, I., Hrsg. (1997). Immunology methods manual. (San Diego: Academic Press, Inc.; Harcourt Brace & Company).
- Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A. und Sercarz, E. E. (1992). Spreading of T cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155-157.
- Lehmann, P. V., Sercarz, E. E., Forsthuber, T., Dayan, C. M. und Gammon, G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T cell repertoire. *Immunol. Today* 14, 203-208.
- Lieber, M. R. (1991). Site-specific recombination in the immune system. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 5.
- Lipton, H. L. und Dal Canto, M. C. (1976). Theiler's virus-induced demyelination: prevention by immunosuppression. *Science* 192, 62.
- Liu, G. Y., Fairchild, P. J., Smith, R. M., Prowle, J. R., Kioussis, D. und Wraith, D. C. (1995). Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3, 407-415.
- Lucchinetti, C., Brück, W. und Noseworthy, J. (2001). Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 259-269.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. und Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C. F., Brück, W., Rodriguez, M. und Lassmann, H. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol.* 6, 259-274.
- Maccalli, C., Farina, C., Sensi, M., Parmiani, G. und Anichini, A. (1997). TCRbeta-chain variable region-driven selection and massive expansion of HLA-class I-restricted antitumor CTL lines from HLA-A\*0201<sup>+</sup> Melanoma Patients. *J. Immunol.* 158, 5902-5913.
- Maini, M. K., Casorati, G., Dellabona, P., Wack, A. und Beverley, P. C. L. (1999). T cell clonality in immune responses. *Immuol. Today* 20, 262-266.
- Marrack, P., Kappler, J. und Kotzin, B. L. (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat. Med.* 7, 899-905.
- Martin, R. und McFarland, H. F. (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 32, 121-182.
- Martin, R., Stürzebecher, C.-F. und McFarland, H. F. (2001). Immunotherapy of multiple sclerosis: Where are we? Where should we go? *Nat. Immunol.* 2, 785-788.
- Mason, D. (1998a). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* 19, 395-404.

- Mason, D. und Powrie, F. (1998b). Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 649-655.
- Massa, P. T., Ozato, K. und McFarlin, D. E. (1993). Cell type-specific regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons. *Glia.* 8, 201-207.
- Matis, L. A. (1990). The molecular basis of T cell specificity. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 65-82.
- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L. und Chenchik, A. (1999). Amplification of cDNA ends based on template-switching-effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 1558-1560.
- McCallum, K., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W. und Booss, J. (1987). T cell subsets in multiple sclerosis. Gradients at plaque borders and differences in nonplaque regions. *Brain.* 110, 1297-1308.
- Meinl, E. (1999). Concepts of viral pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 303-307.
- Miller, S. D., McRae, B. L., Vanderlugt, C. L., Nikcevich, K. M., Pope, J. G., L., P. und Karpus, W. J. (1995). Evolution of the T-cell repertoire during the course of experimental immune-mediated demyelinating diseases. *Immunol. Rev.* 144, 225-244.
- Miller, S. D., Vanderlugt, C. L., Smith-Begolka, W., Pao, W., Yauch, R. L., Neville, K. L., Katz-Levy, Y., Carrizosa, A. und Kim, B. S. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* 3, 1133-1136.
- Monteiro, J., Hingorani, R., Peroglizzi, R., Apatoff, B. und Gregersen, P. K. (1996). Oligoclonality of CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 23, 127-138.
- Monteyne, P., Bureau, J.-F. und Brahic, M. (1998). Viruses and multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 11, 287-291.
- Moss, P. A. H. und Bell, J. I. (1995). Sequence analysis of the human alpha beta T cell receptor CDR3 region. *Immunogenetics* 42, 10-18.
- Müller, D. L., Jenkins, M. K. und Schwartz, R. H. (1989). Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445-480.
- Murray, P. D., McGraven, D. B., Lin, X., Njenja, M. K., Leibowitz, J., Pease, L. R. und Rodriguez, M. (1998a). Perforin-dependent neurological injury in a viral model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 18, 7305-7314.
- Murray, P. D., Pavelko, K. D., Leibowitz, J., Lin, X. und Rodriguez, M. (1998b). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J. Virol.* 72, 7320-7329.
- Noseworthy, J. H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature.* 399 (6738 Suppl), A40-47.

- Ohashi, P. S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C. T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R. M. und Hengartner, H. (1991). Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-317.
- Oksenberg, J. R., Panzara, M. A., Begovich, A. B., Mitchell, D., Erlich, H. A., Murray, R. S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C. C. und Steinman, L. (1993). Selection for T-cell receptor V beta-D beta-J beta gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature*. 362, 68-70.
- Oksenberg, J. R., Stuart, S., Begovich, A. B., Bell, R. B., Erlich, H. A., Steinman, L. und Bernard, C. C. (1990). Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature*. 345, 344-346; Published erratum appears in *Nature* 1991 Sep 5;353 (6339):94.
- Oldstone, M. B. A., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J. und Lewicki, H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65, 319-332.
- Olivares-Villagomez, D., Wang, Y. und Lafaille, J. J. (1998). Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 188, 1883-1894.
- Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojeberg, B., Ekre, H. P., Andersson, G., Olerup, O. und Link, H. (1992). Increased numbers of T cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 22, 1083-1087.
- Ota, K., Matsui, M., Milford, E. L., Mackin, G. A., Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1990). T cell-recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183-187.
- Ozawa, K., Suchanek, G., Breitschopf, H., Brück, W., Budka, H., Jellinger, K. und Lassmann, H. (1994). Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain*. 117, 1311-1322.
- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M. und Lanzavecchia, A. (1993). Expression of two T cell receptor alpha chains: Dual receptor T cells. *Science* 262, 422-424.
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Schindler, J. und Johnson, K. P. (1987). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.
- Pannetier, C., Even, J. und Kourilsky, P. (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today*. 16, 176-181.
- Paterson, P. Y. (1960). Passive transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.* 111, 119-136.
- Piddlesden, S. J., Lassmann, H., Zimprich, F., Morgan, B. P. und Linington, C. (1993). The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am. J. Pathol.* 143, 555-564.

- Posnett, D. N., Sinha, R., Kabak, S. und Russo, C. (1994). Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J. Exp. Med.* 179, 609-618; Published erratum appears in *J Exp Med* 1994 Mar 1;179(3):1077.
- Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M. und Kourilsky, P. (1994). Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J. Immunol.* 153, 2807-2818.
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H. und Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: A method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.* 201, 331-335.
- Rivera-Quifiones, C., McGavern, D., Schmelzer, J. D., Hunter, S. F., Low, P. A. und Rodriguez, M. (1998). Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 4, 187-193.
- Rivers, T. M. und Schwentker, F. F. (1935). Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J. Exp. Med.* 61, 689-702.
- Robey, E. und Fowlkes, B. J. (1998). The alpha beta versus gamma delta T-cell lineage choice. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 181-187.
- Roers, A., Hansmann, M. L., Rajewsky, K. und Küppers, R. (2000). Single-cell PCR analysis of T helper cells in human lymph node germinal centers. *Am. J. Pathol.* 156, 1067-1071.
- Roers, A., Montesinos-Rongen, M., Hansmann, M. L., Rajewsky, K. und Küppers, R. (1998). Amplification of TCRbeta gene rearrangements from micromanipulated single cells: T cells rosetting around Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease are polyclonal. *Eur. J. Immunol.* 28, 2424-2431.
- Romeis, B. (1989). *Mikroskopische Technik.*, 17. Aufl., P. Böck, Hrsg. (München: Urban + Schwarzenberg).
- Rosenberg, W. M., Moss, P. A. und Bell, J. I. (1992). Variation in human T cell receptor V beta and J beta repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.* 22, 541-549.
- Rowen, L., Koop, B. F. und Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T-cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.
- Schütze, K. und Lahr, G. (1998). Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nature Biotechnol.* 16, 737-742.
- Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J. S., Weksler, M. E., Posnett, D. N., Pannetier, C., Kourilsky, P. und Even, J. (1997). Expanded CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells clones in elderly humans. *J. Immunol.* 158, 4493-4499.
- Schwartz, R. H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1355.
- Scotet, E., Peyrat, M. A., Saulquin, X., Retiere, C., Couedel, C., Davodeau, F., Dulphy, N., Toubert, A., Bignon, J. D., Lim, A., Vie, H., Hallet, M. M., Liblau, R., Weber, M., Berthelot, J. M., Houssaint, E. und Bonneville, M. (1999). Frequent enrichment for CD8 T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions: towards a reassessment of the physiopatho-

- logical significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.* 29, 973-985.
- Sobel, R. A. (1989). T-lymphocyte subsets in the multiple sclerosis lesion. *Res. Immunol.* 140, 208-211.
- Sobel, R. A., Hafler, D. A., Castro, E. E., Morimoto, C. und Weiner, H. L. (1988). The 2H4 (CD45R) antigen is selectively decreased in multiple sclerosis lesions. *J. Immunol.* 140, 2210-2214.
- Sobel, R. A. und Kuchroo, V. K. (1992). The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis induced with myelin proteolipid protein. *J. Immunol.* 149, 1444-1451.
- Steinman, L. (1996a). A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2253-2256.
- Steinman, L. (1996b). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
- Steinman, L. (2001). Myelin-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, F27-F30.
- Stone, S. H. (1961). Transfer of allergic encephalomyelitis by lymph node cells in inbred guinea pigs. *Science* 134, 619-620.
- Strauss, G. H. (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte test (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* 252, 1-15.
- Strobel, S. und Mowat, A. M. (1998). Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* 19, 173-181.
- Strohlman, S. A. und Hinton, D. R. (2001). Viral induced demyelination. *Brain Pathol.* 11, 92-106.
- Sun, D., Qin, Y., Chluba, J., Epplen, J. T. und Wekerle, H. (1988). Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature.* 332, 843-845.
- Sun, D., Whitaker, J. N., Huang, T., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H. und Raine, C. S. (2001). Myelin antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* 166, 7579-7587.
- Sun, D., Whitaker, J. N. und Wilson, D. B. (1999). Regulatory T cells in experimental allergic encephalomyelitis. I. Frequency and specificity analysis in normal and immune rats of a T cell subset that inhibits disease. *Int. Immunol.* 11, 307-315.
- Theofilopoulos, A. N. (1995). The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol. Today* 16, 90-98.
- Traugott, U., Reinherz, E. L. und Raine, C. S. (1983b). Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J. Neuroimmunol.* 4, 201-221.
- Traugott, U., Reinherz, E. L. und Raine, C. S. (1983a). Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science.* 219, 308-310.

- Tsuchida, M., Matsumoto, Y., Hirahara, H., Hanawa, H., Tomiyama, K. und Abo, T. (1993). Preferential distribution of V beta 8.2-positive T cells in the central nervous system of rats with myelin basic protein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 23, 2399-2406.
- Tsuchida, T., Parker, K. C., Turner, R. V., McFarland, H. F., Coligan, J. E. und Biddison, W. E. (1994). Autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10859-10863.
- Tuohy, V. K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J. A. und Kinkel, R. P. (1999). Spontaneous regression of primary autoreactivity during chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 189, 1033-1042.
- t'Hart, B. A., van Meurs, M., Brok, H. P. M., Massacesi, L., Bauer, J., Boon, L., Bontrop, R. E. und Laman, J. D. (2000). A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset. *Immunol. Today* 21, 290-297.
- Van de Keere, F. und Tonegawa, S. (1998). CD4<sup>+</sup> T cells prevent spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *J. Exp. Med.* 188, 1875-1882.
- Vizler, C., Bercovici, N., Cornet, A., Cambouris, C. und Liblau, R. S. (1999). Role of autoreactive CD8<sup>+</sup> T cells in organ-specific autoimmune diseases: insight from transgenic mouse models. *Immunol. Rev.* 169, 81-92.
- Weiner, H. L. (2000). Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J. Clin. Invest.* 106, 935-937.
- Wekerle, H. (1998). The viral triggering of autoimmune disease. *Nat. Med.* 4, 770-771.
- Wekerle, H., Bradl, M., Linington, C., Kääh, G. und Kojima, K. (1996). The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol. Rev.* 149, 231-243.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H. und Linington, C. (1994). Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl, S47-53.
- Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H. und Meyermann, R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 9, 271-277.
- Welsh, R. M. (2001). Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J. Exp. Med.* 193, F19-F22.
- Willenbrock, K., Roers, A., Blöhbaum, B., Rajewsky, K. und Hansmann, M. L. (2000). CD8<sup>+</sup> T cells in Hodgkin's disease tumor tissue are a polyclonal population with limited clonal expansion but little evidence of selection by antigen. *Am. J. Pathol.* 157, 171-175.
- Wisniewski, H. M. und Bloom, B. R. (1975). Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell-mediated immune reaction. *J. Exp. Med.* 141, 346-359.
- Woodroffe, M. N., Bellamy, A. S., Feldmann, M., Davison, A. N. und Cuzner, M. L. (1986). Immunocytochemical characterisation of the immune reaction in the central nervous system in multiple sclerosis. Possible role for microglia in lesion growth. *J. Neurol. Sci.* 74, 135-152.

Wucherpfennig, K. W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M. L. und Hafler, D. A. (1992). T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J. Exp. Med.* 175, 993-1002.

Wucherpfennig, K. W., Sette, A., Southwood, S., Oseroff, C., Matsui, M., Strominger, J. L. und Hafler, D. A. (1994). Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J. Exp. Med.* 179, 279-290.

Wucherpfennig, K. W. und Strominger, J. L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705.

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J. D., Suresh, M., Altman, J. D. und Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188, 2205-2213.

Zal, T., Weiss, S., Mellor, A. und Stockinger, B. (1996). Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9102-9107.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 179, 973-984.

Zhang, J., Medaer, R., Hashim, G. A., Chin, Y., van den Berg-Loonen, E. und Raus, J. C. M. (1992a). Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann. Neurol.* 32, 330-338.

Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W. und Arnheim, N. (1992b). Whole genome amplification from a single cell: Implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 5847-5851.

Zinkernagel, R. M. (1996). Immunology taught by viruses. *Science* 271, 173-178.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz erheblicher Forschungsanstrengungen ist die Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) nach wie vor weitgehend ungeklärt. Die MS-Läsion - das charakteristische pathologische Kennzeichen der Krankheit - ist eine scharf abgegrenzte Region in der weißen Substanz des Zentralnervensystems, die durch Entzündung und Demyelinisierung gekennzeichnet ist. T-Zellrezeptor (TCR)- $\alpha\beta^+$  T-Zellen und Makrophagen machen den größten Teil des entzündlichen Zellinfiltrats aus. Obwohl als Ursache eine fehlgeleitete (Auto-) Immunreaktion für wahrscheinlich erachtet wird, die von proinflammatorischen  $CD4^+$ , möglicherweise aber auch  $CD8^+$  T-Zellen getragen wird, besteht letztlich keine Klarheit bezüglich der Bedeutung der T-Zellen im Krankheitsgeschehen. Weitgehend unbekannt sind neben der klonalen Zusammensetzung und dem Rezeptorreperoire der infiltrierenden  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellpopulationen in aktiv demyelinisierenden Läsionen die von ihnen erkannten Antigene.

Aufgrund der großen Diversität der TCR $\beta$ -Ketten ist die Analyse der DNA-Sequenz ihrer V-Regionen dazu geeignet, die klonale Verwandtschaft von T-Zellen zu untersuchen und nach Hinweisen auf Selektion für gemeinsame Antigenpezifitäten zu fahnden. So ließe sich möglicherweise die Fraktion des T-Zellinfiltrats definieren, die für die MS-Pathogenese bedeutsam ist. Einzelne  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen wurden aus immunhistochemisch gefärbten Schnitten von Hirnläsionen, deren demyelinisierende Aktivität histopathologisch genau definiert worden war, mikromanipuliert. Die TCR $\beta$ -V-Regionen dieser einzelnen Zellen wurden mit Hilfe einer Einzelzell-PCR-Technik amplifiziert und direkt sequenziert. Mit dieser Strategie ist es möglich, jede Sequenz exakt einer bestimmten Zelle im Gewebeverband zuzuordnen.

Die Sequenzanalyse ergab, daß die Mehrheit der  $CD8^+$  T-Zellen in beiden analysierten Fällen wenigen Klonen angehörten. Einer dieser Klone repräsentierte 35% der  $CD8^+$  T-Zellen in Fall 1. Ein Vergleich der V-Regionen ergab außerdem für einige der  $CD8^+$  T-Zellen Hinweise auf Selektion für gemeinsame Peptidspezifitäten. Bei einem Vergleich der klonalen Zusammensetzung von  $CD8^+$  T-Zellen aus einer aktiv demyelinisierenden vs. einer inaktiven Läsion zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich fand sich der  $CD8^+$  Klon 1 etwa zweimal häufiger in der inaktiven Läsion. In beiden Fällen waren  $CD4^+$  T-Zellen weniger zahlreich und die klonale Zusammensetzung der  $CD4^+$  T-Zellpopulation war heterogener. Klonal expandierte T-Zellen kamen im Parenchym im Vergleich zu den perivaskulären Bereichen häufiger vor, jedoch waren die größeren  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Klone in beiden Bereichen vertreten.

Um die Frage beantworten zu können, ob die detektierten Klone aktiv an der Gewebszerstörung beteiligt sind, zur Entzündung beitragen oder regulatorische Funktionen ausüben, ist die Bestimmung ihrer Antigenpezifitäten von wesentlicher Bedeutung. In Fall 2 wurden zwei der in situ identifizierten  $CD8^+$  Klone auch in peripherem Blut

des Patienten entdeckt, der eine mittels "CDR3-Spectratyping", der andere mit Hilfe einer sensitiven klonspezifischen PCR. Experimente mit dem Ziel, diese Klone aus dem Patientenblut zu isolieren, waren in einem ersten Versuch nicht erfolgreich. Ein komplementärer Ansatz hat die Koamplifikation sowohl der TCR $\alpha$ - als auch TCR $\beta$ -V-Regionen von einzelnen mikromanipulierten T-Zellen zum Ziel. Daher wurde eine 5'-RACE-Technik auf Einzelzellniveau etabliert, die es erlaubte, für bestimmte, anhand ihrer TCR $\beta$ -Genumlagerungen identifizierte Klone die möglichen TCR $\alpha$ -Umlagerungen zu identifizieren.

Die Klonierung von (in zukünftigen Experimenten zu verifizierenden) Paaren von TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -V-Regionensequenzen in TCR-Expressionsvektoren sollte es ermöglichen, die klonalen Rezeptorspezifitäten in Zelllinien zu transferieren, um anschließend die Peptidspezifitäten in vitro analysieren zu können. In vivo dominierende T-Zellklone mit pathogenem Potential könnten Ziele einer selektiven Immuntherapie sein.

## 7 SUMMARY

Despite extensive research, the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) remains largely enigmatic. The hallmark of MS is the white matter lesion, a clearly demarcated area of inflammation and demyelination within the central nervous system. T cell receptor (TCR)- $\alpha\beta^+$  T cells and macrophages are the major constituents of the inflammatory infiltrate. It is a widely held view that the immediate cause might be a misdirected (auto-) immune reaction mediated by proinflammatory  $CD4^+$  but possibly also  $CD8^+$  T cells. Up to now, the clonal composition as well as the receptor repertoire of the T cell infiltrate is largely unknown. In particular, the nature of the antigen(s) recognized by these T cells is still a matter of debate.

On the basis of the vast diversity of TCR $\beta$  chains, the analysis of their V regions is suitable for analyzing the clonal relationship of T cells as well as searching for signs of selection for common antigenic specificities. Using this approach, it might be possible to define the fraction of the T cell infiltrate which is important for MS pathogenesis. Single  $CD4^+$  and  $CD8^+$  T cells were micromanipulated from immunostained sections of MS lesions whose demyelinating activity had been thoroughly determined by histology. The TCR $\beta$  V regions of those single cells were amplified by means of a single-cell-PCR technique and directly sequenced. This strategy allows one to assign a sequence to the particular T cell from which it was amplified.

Sequence analysis revealed that in both cases investigated, the majority of  $CD8^+$  T cells belonged to few clones. One of these clones accounted for 35% of the  $CD8^+$  T cells in case 1. V region sequence comparison revealed signs of selection for common peptide specificities for some of the  $CD8^+$  T cells. A comparison of the clonal composition of  $CD8^+$  T cells infiltrating an actively demyelinating versus an inactive lesion did not reveal striking differences except for a twofold-higher frequency of  $CD8^+$  clone 1 in the inactive lesion. In both cases, the  $CD4^+$  T cells were less numerous and the clonal composition was more heterogeneous. Clonally expanded T cells were more abundant in the parenchyma compared with the perivascular infiltrates; nevertheless, larger  $CD4^+$  and  $CD8^+$  clones were represented in both locations.

To provide clues to the question of whether the detected clones actively mediated tissue injury, contributed to the inflammatory process, or performed an immunoregulatory function, the determination of their antigenic specificities is vital. In case 2, two of the  $CD8^+$  clones identified in situ were also detected in the patient's peripheral blood, one by "CDR3 spectratyping", the other by a sensitive clone-specific PCR. Experiments aiming at the isolation of these clones from the blood of the patient were unsuccessful at a first attempt. A complementary approach aims at coamplification of both TCR $\alpha$  and TCR $\beta$  V regions from individual micromanipulated T cells. To this end, a 5'-RACE technique was established at the single cell level which allowed identification

of the putative TCR $\alpha$  V regions for particular clones identified by their TCR $\beta$  rearrangements.

Subsequent to verification of pairs of TCR $\alpha$  and TCR $\beta$  V region sequences in future experiments, cloning of such pairs into TCR expression vectors should allow transfer of clonal receptor specificities to cell lines and subsequent in vitro analysis of peptide specificities. In vivo dominant T cell clones with pathogenic potential could be targets for selective immunotherapy.

## 8 ANMERKUNGEN

Die neuropathologische Charakterisierung der beiden MS-Fälle erfolgte durch Prof. Dr. H. Lassmann, Institut für Hirnforschung, Wien, und die "CDR3-Spektratyping"-Analyse entstand in Kooperation mit Dr. N. Goebels und Prof. Dr. R. Hohlfeld, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried. Das HLA-Typing der MS-Fälle erfolgte im Labor für Immungenetik, München, durch Dr. E. Keller und Prof. Dr. E. D. Albert.

Ein Teil der Daten aus der T-Zellrepertoire-Analyse war bereits vor Antritt meiner Stelle in Köln durch Dr. A. Roers, Dr. A. Waisman, A. Klöckner und A. Rosenbaum erhoben worden.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus Rajewsky betreut worden.

Holger Babbe

### **Teilpublikation:**

Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schröder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky. 2000. Clonal expansions of CD8<sup>+</sup> T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell PCR. *J. Exp. Med.* 192:393-404. (geteilte Erstautorenschaft)

## **Danke!**

Die vier Jahre in der AG Rajewsky war mir - im besten Sinne - strenge und lehrreiche Schule zugleich. Die professionelle und verständnisvolle Hilfe der beteiligten Personen bedeuteten für mich genauso eine stete Motivation wie die spannende Thematik meines Projekts. Am Zustandekommen dieser Arbeit sowie am angenehmen Arbeitsklima hatten viele Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter ihren Anteil; die folgenden Personen möchte ich besonders erwähnen:

Besonders dankbar bin ich meinem Betreuer Dr. Axel Roers für die Zeit der hervorragenden Zusammenarbeit, sein Vertrauen und die sehr hilfreiche konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit. Vieles, was ich während der Promotionszeit gelernt habe, verdanke ich seiner engagierten Person.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. K. Rajewsky gilt mein Dank für die stete Unterstützung meines Projekts wie auch meiner Person, die professionelle Betreuung und viele Lektionen in Sachen Selbständigkeit.

PD Dr. R. Küppers danke ich für viele hilfreiche Diskussionen und die vielfältige Unterstützung in wissenschaftlichen, aber auch nicht-wissenschaftlichen Belangen. Ich danke ihm für das kritische Lesen meiner Dissertation.

Sehr verbunden bin ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, Köln, meinem hauptsächlichen Arbeitsplatz. Von ihnen erfuhr ich nicht nur stete Unterstützung in meinem Arbeitsalltag, sie trugen auch zu einem großen Teil zum freundlichen Arbeitsklima bei.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H.-P. Dienes für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Dr. M. Odenthal für vielfältige Unterstützung. Weiterhin danke ich Dr. M. Friese und Prof. Dr. R. Schröder für die Hilfestellung bei unseren neuropathologischen Fragen.

An dieser Stelle seien meine "Room-Mates" erwähnt - Holger Kanzler, Dietrich Grimme, Elli Haskamp, Teresa Biermann und Mario Zierden -, mit denen ich eine Menge Spaß hatte. Dietrich Grimme möchte ich für seine hilfreichen Kommentare danken.

Julia Jesdinsky und Mirela Stecki danke ich für die Hilfe beim Sequenzieren, Christoph Göttlinger für die Unterstützung am FACS-Sorter und bei Computerfragen.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. H. Lassmann, Dr. N. Goebels, Prof. Dr. R. Hohlfeld sowie Dr. E. Keller und Prof. Dr. E. D. Albert für die fruchtbare Zusammenarbeit.

## Curriculum vitae - Holger Horst Dieter Babbe

**Adresse:** Institut für Genetik  
Abteilung für Immunologie  
Universität zu Köln  
Weyertal 121  
50931 Köln

**E-Mail:** Holger.Babbe@uni-koeln.de

**Geburtstag/-ort:** 8. September 1969 in Augsburg

**Familienstand:** Ledig

### Ausbildung:

seit 1997 Promotionsstudium am Institut für Genetik, Abteilung für Immunologie (Prof. Dr. K. Rajewsky), Universität zu Köln.  
Titel der Arbeit: "Infiltrierende T-Lymphozyten bei Multipler Sklerose: Analyse von Rezeptorrepertoire und Antigen-spezifitäten auf dem Niveau einzelner Zellen."

1991 - 1997 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Würzburg.  
Diplomarbeit am Zentrum für Infektionsforschung (Prof. Dr. H. Moll), Universität Würzburg.  
Titel der Arbeit: "Analyse der T-Zellreaktion gegen gereinigtes Lipophosphoglykan von *Leishmania major*".

1990 - 1991 Studium der Biogeographie (Diplom) an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

1980 - 1989 Rudolf-Diesel-Gymnasium (Abschluß: allgemeine Hochschulreife), Augsburg.

### Zivildienst:

1989 Sanitätsdienst beim Bayerischen Roten Kreuz, Augsburg.

Köln, den 15. November 2001

Holger Babbe