

Aus dem
DRK - Blutspendedienst
Baden Württemberg - Hessen

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Erhard Seifried

**Untersuchung der Antigenpezifität der
T-Zellantwort gegen substituiertes FVIII-Protein in
Gerinnungsfaktor VIII E-17- KO - Mäusen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Stefan Löckermann
aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2009

1	Einleitung	1
1.1	Hämophilie A – Krankheitsbild und gegenwärtige Therapie	1
1.1.1	Hämophilie A und Blutgerinnung	1
1.1.2	Klinisches Bild	4
1.1.3	Diagnose	5
1.1.4	Therapie	6
1.2	Der Gerinnungsfaktor VIII	7
1.2.1	Das Faktor VIII-Gen	7
1.2.2	Das FVIII-Protein	8
1.2.3	Mutationen im FVIII-Gen und ihre Konsequenzen auf Proteinebene	12
1.3	Komplikationen einer Behandlung der Hämophilie A	14
1.3.1	Klassifikation von FVIII-Antikörpern	16
1.3.2	Mechanismen der FVIII-Inhibition	17
1.4	Antigenerkennung und Lymphozytenaktivierung	19
1.4.1	Überblick über die Lymphozytenpopulationen	19
1.4.2	Antigenerkennung durch T-Zellen - der „major histocompatibility complex“	20
1.4.3	Antigenverarbeitung und Präsentation	24
1.4.4	Der T-Zellrezeptorkomplex und kostimulierende Oberflächenmoleküle	26
1.4.5	Zytokine	28
1.4.6	Die T-Zell-vermittelte Immunantwort	30
1.4.7	Die Aktivierung der humoralen Immunantwort	32
1.4.8	Die Rolle der T-Zellen bei der Induktion von Hemmkörpern gegen FVIII	34
1.5	Tiermodell der Hämophilie A	36
1.6	Zielsetzung der Arbeit	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Materialien	38
2.1.1	Technische Apparate und Verbrauchsmaterialien	38
2.1.2	Reagenzien, Medium, Zusätze	39
2.1.3	Antikörper, Zytokine	40
2.1.4	Verwendete Testkits	40
2.1.5	Angesetzte Pufferlösungen	40
2.1.6	Mäuse	41
2.2	Peptide	42
2.2.1	Auswahl der Peptide und Herstellung von Einzelpeptidlösungen und Peptidpools	44
2.3	Zell- und molekularbiologische Methoden	48
2.3.1	Intravenöse und intraperitoneale Immunisierung der Mäuse	48
2.3.2	Organentnahme und Zellpräparation	48
2.3.3	Isolierung von T-Lymphozyten (CD4 ⁺) und antigenpräsentierenden Zellen (CD90 ⁺) durch magnetische Zellseparation	49
2.3.4	Messung der spezifischen Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand (Cytometric Bead Array)	51
2.3.5	Allgemeine Kulturbedingungen	54

2.3.6	Quantitative Nachweismethode antigenreaktiver T-Zellen (IFN- γ -Elispot)	54
2.3.7	Durchflusszytometrische Analyse	57
2.4	Analyse der Bindungsaffinität von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Verteilung der T _H 1- und T _H 2-spezifischen Zytokinmuster in FVIII immunisierten FVIII E-17-Knockout-Mäusen	59
3.2	Bestimmung der Frequenz Ovalbumin-spezifischer T-Helferzellen in Balb/c Mäusen mittels Elispot	63
3.3	Untersuchungen zur Optimierung der Dauer einer Restimulation sensibilisierter T-Helferzellen für eine Frequenzbestimmung mittels Elispot	65
3.4	CD4 ⁺ -T-Zellantwort gegen das Modellantigen Ova-Peptid ₃₂₃₋₃₃₉ in einem Peptidgemisch aus 15 unterschiedlichen FVIII-Peptiden	67
3.5	Untersuchung der FVIII-spezifischen CD4 ⁺ -T-Zellantwort in FVIII-Knockout-Mäusen nach Restimulation mit rFVIII-Protein und FVIII-Peptiden	68
3.6	FVIII-Peptidpoolscreening	75
3.7	FVIII-Einzelpeptidscreening	79
3.8	Untersuchung der Bindungsaffinität von FVIII-Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle in FVIII-Knockout-Mäusen	81
4	Diskussion	85
4.1	Rolle der T _H 1- und T _H 2-Zellen bei der Immunantwort gegen rFVIII	85
4.2	Kinetik antigenspezifischer CD4 ⁺ -T-Zellen in Ovalbumin-immunisierten Balb/c-Mäusen	86
4.3	Untersuchungen zur Restimulation Ovalbumin-sensibilisierter T-Helferzellen mit dem Ova-Peptid (Ova ₃₂₃₋₃₃₉) in einem Gemisch irrelevanter Peptide	88
4.4	Analyse der FVIII-spezifischen T-Helferzellantwort in FVIII-Knockout-Mäusen	88

4.5	Epitopmapping von T-Helferzellen pdFVIII immunisierter FVIII-Knockout-Mäuse	90
4.5.1	FVIII-Peptidpoolscreening	90
4.5.2	FVIII-Einzelpeptidscreening	91
4.6	Vorhersage der FVIII-Peptidbindung an MHC-Klasse-II-Moleküle der FVIII-Knockout-Maus	95
5	Literaturverzeichnis	96
6	Zusammenfassung	114
7	Abkürzungsverzeichnis	116
	Publikationen und Kongressbeiträge	118
	Lebenslauf	122
	Danksagung	124

1 Einleitung

1.1 Hämophilie A – Krankheitsbild und gegenwärtige Therapie

1.1.1 Hämophilie A und Blutgerinnung

Eine Gefäßverletzung kann beim Menschen einen lebensbedrohlichen Zustand darstellen. Die physikalischen und biochemischen Reaktionen des menschlichen Organismus auf eine blutende Verletzung werden unter dem Begriff Hämostase zusammengefasst.

Der Verschluss eines verletzten Gefäßes erfolgt auf drei Ebenen:

- Vaskulär durch reflektorische Kontraktion des verletzten Gefäßes durch Reizung glatter Muskelzellen
- Zellulär durch Thrombozytenadhäsion an Kollagenfasern des Bindegewebes, die bei der Verletzung des Gefäßes freigelegt werden
- Plasmatisch durch Vernetzung der Thrombozyten mit Fibrin, dem Endprodukt des plasmatischen Gerinnungssystems

Die Hämophilie A ist die häufigste erbliche Störung der Blutgerinnung. Die Ursache für die Erkrankung liegt in der fehlenden oder verminderten Aktivität des Faktor VIII (FVIII)-Proteins, das eine zentrale Rolle im plasmatischen Gerinnungssystem spielt (Abb. 1.1). Das plasmatische Gerinnungssystem besteht aus 15 Gerinnungsfaktoren (Tab. 1.1), zumeist Proteinen, Sie liegen im Plasma in ihrer inaktiven Form als Proenzym vor. Gerinnungsfaktoren werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit römischen Ziffern benannt. Ihr aktivierter Zustand wird durch den Index „a“ bezeichnet. Man unterscheidet je nach Initiation der Gerinnungskaskade zwischen einer exogenen und einer endogenen Aktivierung. Durch Gewebeschädigung und Freisetzung von Phospholipiden aus Thrombozyten oder Gefäßen und umliegendem Gewebe wird eine Kette enzymatischer Reaktionen im Plasma in Gang gesetzt. Die beteiligten Faktoren liegen als inaktive Proteine vor, aus denen durch Proteolyse aktive Serinproteasen bzw. essentielle Kofaktoren werden, die in gerinnungsaktiven Komplexen miteinander und mit aktivierten Thrombozyten zusammenwirken. Positive Rückkopplung führt zur Verstärkung auslösender Signale. Am Ende der Kaskade steht die Generierung von Thrombin, das die Bildung von Fibrinmonomeren katalysiert (Mann, 1999; Heemskerk et al., 2002).

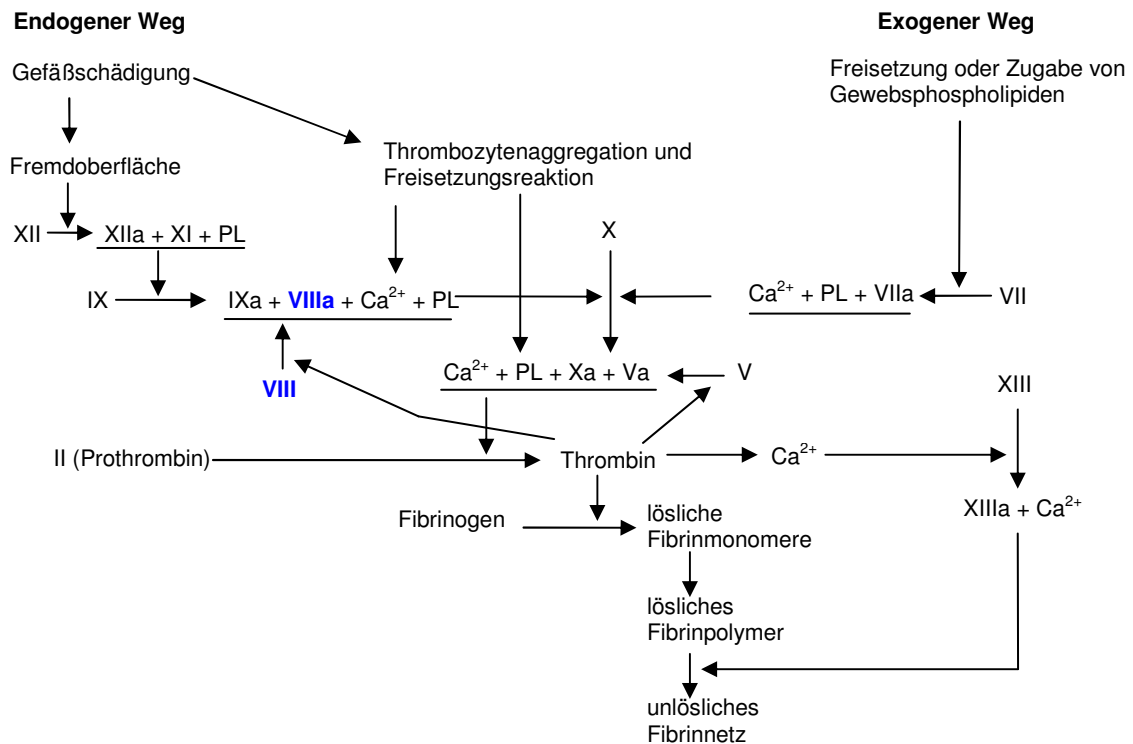


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Die zentralen gerinnungsaktiven Komplexe zur Bildung von FXa und Thrombin sind im Schema unterstrichen. Das System enthält eine Reihe von positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen, die in diesem Schema nicht dargestellt sind (nach Begemann, 1999).

Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren wird sowohl durch Rückkopplung als auch durch inaktivierende Enzyme bzw. Proteine reguliert. Im Normalzustand herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gerinnungsaktivierenden und -inaktivierenden Reaktionen, das die intravasale Fließeigenschaft erhält.

FVIII ist ein Glykoprotein ohne eigene enzymatische Aktivität, das als Kofaktor unverzichtbar für die Aktivität der Serinprotease Faktor IX (FIX) ist, den Faktor X (FX) zu Xa aktiviert. Da FVIII und FIX in einem gemeinsamen Komplex in der Gerinnungskaskade aktiv sind, besitzen beide Defizienzen (im Fall des FIX-Mangels Hämophilie B genannt) sehr ähnliche klinische Symptome (Kaufman, 1999).

Faktor bzw. Abkürzung	Synonyme	Konzentration im Plasma (µg/ml)	Funktion
I	Fibrinogen	1500 - 4000	Gerinnselbildung
II	Prothrombin	100 – 200	Serinprotease, bildet aus Fibrinogen Fibrin
III	Gewebsthromboplastin Gewebsthrombokinas	0	bildet mit FVIIa einen Komplex und aktiviert FX zu FXa
IV	Ca ²⁺ -Ionen	2,15 – 2,75 (mmol/l)	notwendig für die Interaktion von Gerinnungsfaktoren mit Phospholipidoberflächen
V, AcG	Akzeleratorglobulin Proakzelerin	5 – 10	Kofaktor, beschleunigt FII-Aktivierung
VI	<i>nicht bekannt</i>		
VII	Procouvertin	1 – 2	Serinprotease, aktiviert FX
VIII,AHF	Antihämophiler Faktor A	0,05 0,2	Kofaktor, beschleunigt FX-Aktivierung durch FIX; gebunden an von Willebrand Faktor (VWF)
IX,PTK	Christmas-Faktor, Plasmathromboplastin-Komponente	3 – 4	Serinprotease, aktiviert FX
X	Stuart-Prower-Faktor, Plasmathromboplastin	6 – 8	Serinprotease, aktiviert FII
XI, PTA	Rosenthal-Faktor, Plasmathromboplastin antecedent	4 – 7	Serinprotease, aktiviert FIX
XII	Hagemann-Faktor	20 - 50	Serinprotease, aktiviert FXI und Präkallikrein
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	12 – 25	Transglutaminase, stabilisiert das Fibringerinnsel
PK	Fletcher-Faktor, Präkallikrein	15 – 45	Serinprotease, aktiviert FXII, Plasminogen, spaltet Hochmolekulargewicht-Kininogen, Bradykinin
HMWK	Fitzgerald-Faktor, Hochmolekulargewicht-Kininogen	70 - 90	Kofaktor, beschleunigt F-XII-Kontaktaktivierung

Tab. 1.1. Gerinnungsfaktoren (nach Forth, 1996).

1.1.2 Klinisches Bild

Das klinische Erscheinungsbild der Hämophilie A wird bestimmt von einer vermehrten Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese) und der Unstillbarkeit von Blutungen nach Verletzungen oder operativen Eingriffen. Charakteristisch für die Hämophilie A sind im weiteren Krankheitsverlauf rezidivierende Blutungen in Gelenke (vor allem Knie, Sprunggelenk und Ellenbogen) und Muskulatur, die schwerwiegende Entzündungen verursachen und zu Gelenkdeformation und Verkrüppelung führen können (Hoyer, 1994; Mannucci & Tuddenham, 2001). Sowohl spontane als auch posttraumatische oder iatrogene Blutungen sind für die Patienten oft lebensgefährlich, wenn sie nicht rechtzeitig behandelt werden. Der Schweregrad der Erkrankung korreliert häufig mit dem Anteil an FVIII-Aktivität im Plasma der Patienten (Tab. 1.2). Etwa die Hälfte der Patienten leidet unter „schwerer“ Hämophilie mit weniger als 1% FVIII-Plasmaaktivität im Vergleich zum Bevölkerungsdurchschnitt. Bei ungefähr 10% der Patienten wird eine „mittelschwere“ Hämophilie mit 1-5% FVIII-Aktivität diagnostiziert, und 30-40% der Patienten haben eine „leichte“ Form der Hämophilie. Menschen mit FVIII-Spiegeln über 30% des Normwertes zeigen meist keine Symptome (Antonarakis, 1998; World Federation of Hemophilia, 2005). Aufgrund der Lokalisation des FVIII-Gens auf dem X-Chromosom und des rezessiven Erbgangs sind überwiegend Männer von der Krankheit betroffen. Heterozygote Trägerinnen (Konduktorinnen) besitzen in der Regel verringerte FVIII-Spiegel von 30-70%; die Trägerinnen bleiben klinisch unauffällig (Kasper, 2000). Die Inzidenz in der Bevölkerung liegt bei ungefähr 1-2 Fällen je 10000 männliche Neugeborene (Rosendaal et al., 1991; Nathwani & Tuddenham, 1992).

Die Hämophilie B („Christmas disease“, FIX-Mangel), unterscheidet sich weder in den Symptomen noch im Erbgang von der Hämophilie A, tritt aber in einem Verhältnis 1 zu 4 gegenüber der Hämophilie A seltener auf.

Nachdem in den frühen 1980er Jahren in Westeuropa und Nordamerika 60-70% der Hämophilie A-Patienten durch kontaminierte Blutprodukte mit HIV infiziert wurden, ist AIDS immer noch die häufigste Todesursache dieser Patientengruppe. Weitere Spätfolgen der Behandlung mit kontaminierten Produkten vor 1986 sind Lebererkrankungen aufgrund von Infektionen mit Hepatitis B- und C-Viren (HBV bzw. HCV) (Lee, 1996; Giangrande, 1998; Mannucci & Giangrande, 2000). Zudem zeigt eine Studie aus den USA, dass Hämophilie A-Patienten im Vergleich zu einem Normalkollektiv ein signifikant erhöhtes Risiko besitzen, an Herzinfarkt, Krebs oder Nierenerkrankungen zu versterben (Soucie et al., 2000).

FVIII-Aktivität im Plasma		
FVIII-Aktivität	Klassifikation	Symptome
<1%	Schwer	Häufig spontane Muskel- und Gelenkblutungen und posttraumatische Blutungsepisoden; Gelenkdeformation und Verkrüppelung bei unzureichender Behandlung
1% - 5%	Mittelschwer	Blutungsepisoden nach Verletzungen oder operativen Eingriffen, selten spontane Blutungen
5% - 30%	Leicht	Verstärkte Blutungsneigung postoperativ oder nach Verletzungen

Tab. 1.2. Korrelation zwischen FVIII-Plasmaaktivität und Schweregrad der Hämophilie A (Hoffbrand et al., 1997; Kasper, 2000). Die Angaben zur FVIII-Aktivität beziehen sich auf den Durchschnitt eines Normalkollektivs von 100%, wobei die Schwankungen des Normalbereichs mit etwa 40-180% recht groß sein können (Kasper, 2000).

Bei Zugang zu optimalen Therapiemöglichkeiten (einschließlich „sicheren“ Präparaten ohne virale Kontamination) liegt die Lebenserwartung eines Hämophilie A-Patienten ungefähr zehn Jahre unter dem jeweiligen nationalen Durchschnitt. Ohne Behandlung versterben jedoch viele Patienten innerhalb der ersten zwei Lebensjahrzehnte (Antunes, 2002).

1.1.3 Diagnose

Die wichtigsten Laborbefunde, die auf eine Hämophilie A hindeuten, sind eine verringerte FVIII-Plasmakonzentration, die in der Regel als Aktivität (FVIII:C), nicht als Protein-Antigenkonzentration (FVIII:Ag) bestimmt wird, und bei schweren Hämophilien eine Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT). Des Weiteren stehen mit der Polymerasekettenreaktion (PCR), der DNA-Sequenzierung, der Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) und verschiedenen anderen molekulargenetischen Methoden Verfahren zur Verfügung, mit denen die molekulare Ursache der Hämophilie A (siehe 1.2.3) genau charakterisiert werden kann (Oldenburg, 2001). Nach der Gewinnung fötaler Zellen durch Chorionzottenbiopsie, Amniozentese oder Punktion der Nabelschnurvene ist eine pränatale Diagnose möglich (Hoffbrand et al., 1997).

1.1.4 Therapie

Die Therapie der Wahl besteht in einer Substitution von FVIII-Konzentraten, die intravenös injiziert werden. Die Präparation der entsprechenden Konzentrate erfolgt durch Aufreinigung aus Spenderplasma oder gentechnisch durch Expression der klonierten Gerinnungsfaktoren in Zellkultur. Um einen ausreichenden Gerinnungsstatus zu erreichen, genügt eine FVIII:C-Konzentration im Plasma von 15 bis 30 Prozent. Bei schweren Blutungen und einer bevorstehenden Operation wird die FVIII-Konzentration auf mindestens 50 % angehoben. Zur Berechnung der zu applizierenden Menge gilt die Faustregel, dass eine IU FVIII pro Kilogramm Körpergewicht die Plasmakonzentration um etwa 0,02 Prozent erhöht. Die FVIII-Halbwertszeit im Plasma liegt im Durchschnitt bei 12 bis 14 Stunden, so dass bei akuten Phasen täglich injiziert werden muss, vor allem dann, wenn ein stetiger Verbrauch des FVIII in der Gerinnung erfolgt.

Man unterscheidet bei den Therapieformen „on-demand“-Substitution und Prophylaxe (Rosendaal et al., 1991). Letztere wird heute durch die Verwendung von tragbaren Mini-Injektions-Pumpen erleichtert, welche eine kontinuierliche FVIII-Zufuhr ermöglichen.

Zur Behandlung der Hämophilie A sind erste Aufreinigungen des FVIII aus dem Plasma durch die Arbeitsgruppe von Pool 1964 mit der Kryopräzipitation des damals als Anti-Hämophilie-Faktors (AHF) bezeichneten Komplexes aus VWF und FVIII gelungen (Pool, 1964). Weitergehende Präparationen des FVIII gestalteten sich wegen dessen geringer Konzentration bzw. seiner hohen Instabilität und Sensitivität gegen Serum-Proteasen als schwierig. Um 1980 wurde die cDNA des FVIII-Gens kloniert. Sie ermöglichte die Herstellung gentechnischer (rekombinanter) Produkte, die seit 1992 zugelassen sind (Gitschier et al., 1984; Toole et al., 1984; Vehar et al., 1984 und Wood et al., 1984). Heute stehen für die Therapie zwei Formen von lyophilisiertem FVIII zur Verfügung:

- aus Plasma aufgereinigter FVIII („plasma derived“-Gerinnungsfaktor VIII)
- rekombinant erzeugter FVIII („recombinant“-Gerinnungsfaktor VIII)

Obwohl FVIII-Konzentrate seit über 20 Jahren in vielen Ländern verfügbar sind, findet man bei Durchsicht der Fachartikel unterschiedliche Angaben zur Dauer der Therapie und zur Höhe der zu substituierenden FVIII-Dosis, abhängig vom Typ der Blutung (Bolton-Maggs et al., 2004).

In Ländern, in denen FVIII-Konzentrate nicht in ausreichender Menge verfügbar sind, werden Kryopräzipitate und Frischplasma-Präparate aus Spenderblut verwendet (Srivastava, 1998; Srivastava, 1999).

Patienten mit leichter und mittelschwerer Hämophilie A kann Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin; DDAVP) verabreicht werden, das durch Freisetzung von FVIII und von Willebrand-Faktor (vWF) zu moderater Erhöhung des FVIII-Plasmaspiegels führt. DDAVP kann auch mit Tranexaminsäure oder ϵ -Aminocapronsäure gegeben werden, die die DDAVP-vermittelte Freisetzung von fibrinolytisch aktivem Plasminogen-Aktivator inhibieren (Cash et al., 1974; Villar et al., 2002).

1.2 Der Gerinnungsfaktor VIII

Zum Verständnis der Hämophilie A ist die Beschreibung des Gens (1.2.1), des transkribierten Proteins (1.2.2) und der Mutationen innerhalb dieses Genlocus und ihrer Konsequenzen auf Proteinebene (1.2.3) erforderlich.

1.2.1 Das Faktor VIII-Gen

Der FVIII-Genlocus liegt etwa 1 Mb entfernt vom distalen Ende des langen Arms des X-Chromosoms (Xq28; Abb. 1.2 A, B). Die FVIII-cDNA ist etwa 186.000 Basenpaare (Bp) lang, entspricht damit 0,1 Prozent des gesamten X-Chromosoms und ist eines der längsten humanen Gene. Die genetische Information für das FVIII-Protein ist auf 26 Exons aufgeteilt (Abb. 1.2C). Deren Länge variiert zwischen 69 und 262 Basenpaaren, mit Ausnahme der Exons 14 und 26, die 3106 bzw. 1985 Basenpaare lang sind. Das mRNA-Transkript besteht aus etwa 9010 Nukleotiden und enthält eine kurze 5'-untranslatierte Region (150 Basen), ein offenes Leseraster mit Stopcodon (7056 Basen) und eine lange 3'-untranslatierte Region (Wood et al., 1984). Es gibt 6 große Introns von jeweils mehr als 14.000 Basenpaaren (Gitschier, 1984).

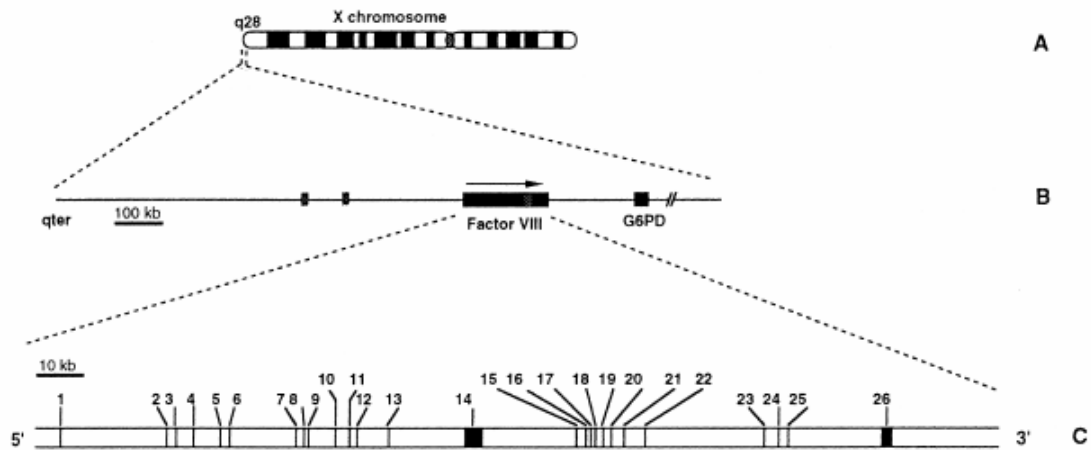


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation und der Struktur des FVIII-Gens. Der Genlocus liegt etwa 1 Mb vom Xq-Telomer entfernt (A, B) und besteht aus 26 Exons (C). Der Pfeil gibt die Richtung der Transkription an (aus Antonarakis, 1998).

1.2.2 Das Faktor VIII-Protein

Von der FVIII-mRNA wird ein Polypeptid mit 2351 Aminosäuren (AS) translatiert. Die ersten 19 Aminosäuren besitzen die Funktion eines Signalpeptids für die Translokation in das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Export aus der Zelle (Toole et al., 1984). Im ER liegt das FVIII-Protein nach Abspaltung des Signalpeptides zunächst als Protein mit 2332 AS und einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa (265 kDa ohne Glykosylierungsanteil) vor (Vehar et al., 1984).

Die Struktur des FVIII-Proteins ist gekennzeichnet durch die Aufteilung in verschiedene Domänen, die zum Teil eine interne Homologie aufzeigen. Die Domänenstruktur ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt. Zwischen den Domänen A1 (AS 1-336), A2 (AS 375-719) und A3 (AS 1690-2019) gibt es Sequenzhomologien von etwa 30%. Weitere Homologien bestehen unter anderem zu Domänen der Proteine Ceruloplasmin und Faktor V (Vehar et al., 1984; Kane & Davie, 1986; Koschinsky et al., 1986).

Zwischen den Domänen A2 und A3 liegt die B-Domäne (AS 741-1648), die vollständig durch das Exon 14 kodiert wird. Im Faktor V ist diese B-Domäne nicht konserviert, und auch die Homologie zu tierischem FVIII ist geringer als in den A- bzw. C-Domänen. Homologien zu anderen Proteinen sind nicht bekannt. Die Deletion der B-Domäne verändert die Gerinnungsaktivität des FVIII nicht, aber möglicherweise ist die „Clearance“ dieses veränderten Moleküls aus dem Plasma erhöht (Berntorp, 1997).

Am Carboxylende des FVIII befinden sich die homologen Domänen C1 (AS 2020-2172) und C2 (2173-2332), die ebenfalls Homologie zum Faktor V und zu Ketten des Discoidin I aufweisen (Vehar et al., 1984; Kane et al., 1987).

Auffallend sind weitere drei Regionen mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäuren). Zwischen A1 und A2 liegt *a1* (AS 337 bis 374); *a2* (AS 720 bis 740) verbindet A2 und B; *a3* liegt zwischen B und A3 (AS 1649 bis 1689) (Abb. 1.3.). Die saure Region *a3* ist für die Assoziation des FVIII an den VWF von Bedeutung (Saenko & Scandella, 1997).

FVIII besitzt 8 intramolekulare Disulfid-Brücken: jeweils zwei innerhalb der Domänen A1 (zwischen AS 153 und 179; AS 248 und 329), A2 (AS 528 und 554; AS 630 und 711), A3 (AS 1832 und 1858; AS 1899 und 1903) und jeweils eine in C1 (zwischen AS 2021 und 2169) (McMullen et al., 1995) bzw. in C2 (AS 2174 und 2326) (Pratt et al., 1999) (Abb. 1.3).

Der größte Anteil des FVIII wird in den Hepatozyten synthetisiert. Immunultrastrukturuntersuchungen wiesen das FVIII-Protein dort sowohl im rauhen Endoplasmatischen Reticulum (ER) als auch im Golgi-Apparat nach (Wion et al., 1985, Zelechowska et al., 1985).

Innerhalb der Zelle und nach der Sezernierung muss das FVIII-Protein mit der Domänenstruktur A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 noch verschiedene posttranslationale Modifikationsschritte durchlaufen, um als aktiver Kofaktor zur Gerinnung beitragen zu können (Lenting et al., 1998).

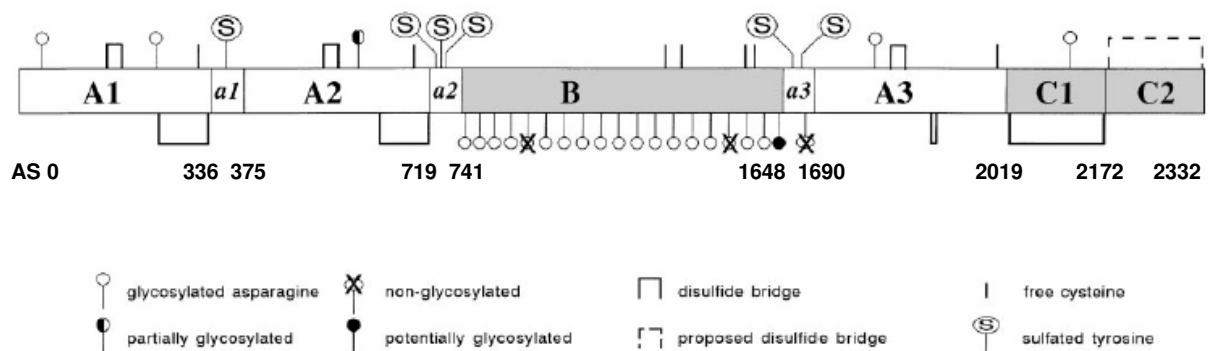


Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der posttranslationalen Prozessierung des FVIII-Proteins. Angegeben sind neben den Domänen und den sauren Regionen (*a1*-*a3*) die N-Glykosylierungsstellen, die sulfatierten Tyrosinreste sowie freie Cysteine und Disulfidbrücken (aus Lenting et al., 1998).

Die Sequenz des FVIII-Proteins enthält 25 potentielle Stickstoff-Glykosylierungsstellen. Von diesen befinden sich 18 in der B-Domäne (Lenting et al., 1998; Moussalli et al., 1999). Die Glykosylierung im ER ist Voraussetzung für die Interaktion von FVIII mit Proteinen wie ERGIC-53 (Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Intermediäres Kompartiment-53) und den Chaperonen Calnexin und Calreticulin, die für den intrazellulären Transport vom ER in den Golgi-Apparat von zu sezernierenden Proteinen wichtig sind (Nichols et al., 1998; Pipe et al., 1998; Moussalli et al., 1999).

Im Golgi-Apparat erfolgt die Sauerstoff-Glykosylierung. Neben der Glykosylierung findet dort auch eine Sulfatierung des Proteins statt. Sechs Tyrosinreste innerhalb der sauren Regionen (AS 346, 718, 719, 723, 1664, 1680) sind sulfatiert (Pittman et al., 1992), und zumindest einige der Sulfate sind notwendig für die effiziente Spaltung und Aktivierung durch Thrombin sowie für die hochaffine Bindung an von Willebrand-Faktor (vWF, siehe unten) und somit für volle FVIII-Aktivität (Michnick et al., 1994; Kjalke et al., 1995).

Die Konzentration des FVIII im Plasma ist im Vergleich zu anderen Proteinen der Gerinnung mit etwa 0,15 µg pro ml sehr niedrig. Isoliert man den FVIII, findet man eine heterogene Mischung aus Heterodimeren mit wenig Einzelketten des Gesamtproteins (Rotblat et al., 1985). Sowohl innerhalb der Zelle als auch im Plasma unterliegt das FVIII-Protein schließlich einer Reihe von proteolytischen Spaltungen, die erst zur Aktivierung und dann zur Inaktivierung führen (Abb. 1.4). Nach einer intrazellulären Spaltung, die nach den Arginin-Resten 1313 und 1648 erfolgen kann, liegt das FVIII-Protein im Plasma zuerst als Heterodimer vor, das aus einer leichten Kette mit den Domänen A3-C1-C2 (etwa 80 kDa) und einer schweren Kette mit den Domänen A1-A2 und Teilen der B-Domäne (90 bis 220 kDa) besteht.

Beide Ketten sind nicht-kovalent durch ein zweiwertiges Cu-Ion verbunden, wobei noch nicht klar ist, welchen Einfluss diese Bindung auf die Struktur und Funktion von FVIII hat. Es ist bekannt, dass aufgereinigte schwere und leichte Ketten zusammen mit Mn(II) oder Ca(II) aktiven FVIII ergeben (Fay, 1999), aber auch für Cu(I) wird der Einfluss in dieser Bindung diskutiert (Bihoreau et al., 1993; Tagliavacca et al., 1997).

Am Ort der Blutgerinnung erfolgt die endgültige Aktivierung durch Thrombin oder FXa, die innerhalb der schweren Kette hinter den Argininresten 372 und 740 und in der leichten Kette nach Arg1689 schneiden, so dass das aktive FVIIIa ein Heterotrimer aus der leichten Kette A3-C1-C2 und den Domänen A1-a1 und A2-a2 darstellt (Eaton et al., 1986). Die leichte Kette und A1-a1 bleiben über ein Metallion assoziiert, während A2-a2 durch elektrostatische Wechselwirkung gebunden wird.

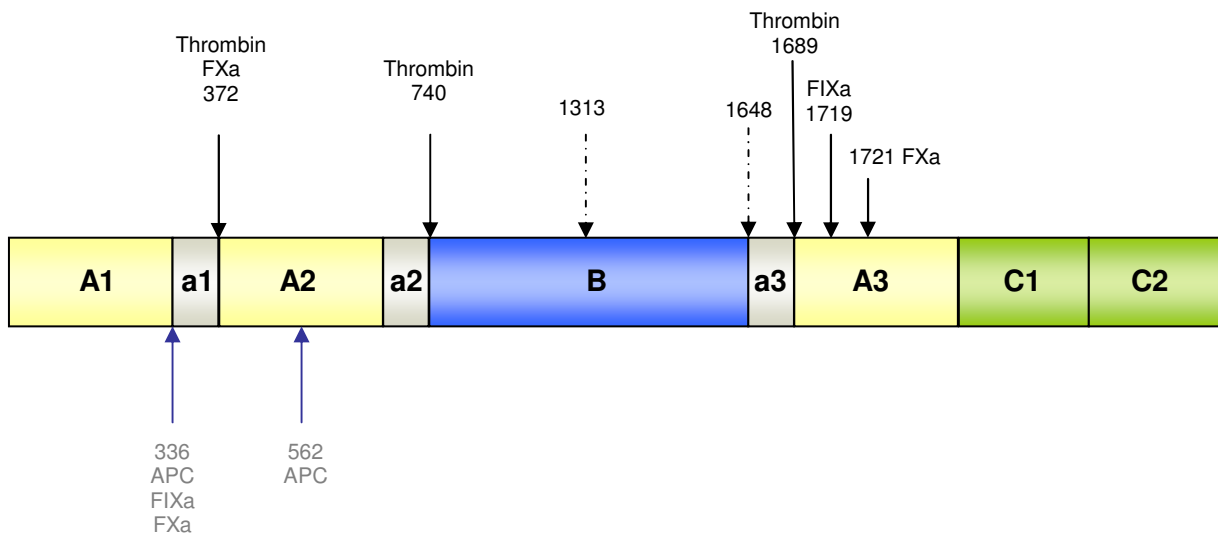


Abb. 1.4. Proteolytische Aktivierung und Inaktivierung von FVIII. FVIII zirkuliert im Plasma überwiegend als Heterodimer aus leichter Kette (a3-A3-C1-C2) und schwerer Kette (A1-a1-A2-a2-B). Die Länge der schweren Kette variiert aufgrund begrenzter Proteolyse, die an den Positionen Arg1313 und Arg1648 schon innerhalb der Zelle stattfinden kann (gestrichelte Pfeile). Zur Aktivierung sind weitere Spaltungen durch Serinproteasen im Plasma erforderlich (durchgezogene schwarze Pfeile), so dass FVIIIa als Heterotrimer von A1-a1, A2-a2 und A3-C1-C2 vorliegt. Die blauen Pfeile zeigen Spaltungen an, die zu Inaktivierung und Abbau des Proteins führen (modifiziert nach Lenting et al., 1998).

Die koagulatorische Funktion von FVIII als Kofaktor in der Gerinnungskaskade erfordert die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. FVIII bindet nach der Sezernierung über die Domänen a3 und C2 als inaktives Protein im Plasma mit hoher Affinität an vWF (Dissoziationskonstante K_d etwa 0,4 nM; Weiss et al., 1977; Tuddenham et al., 1982; Saenko & Scandella, 1997) und wird von diesem stabilisiert und vor Proteolyse geschützt (Wise et al., 1991; Kaufman & Pipe, 1999). Die Assoziation mit vWF erhöht die Halbwertszeit von FVIII im Plasma von 2-3 Stunden auf 12-14 Stunden (Weiss et al., 1977).

Weitere proteolytische Schritte durch Proteasen aus dem Gerinnungssystem (Thrombin, FIXa, FXa, aktiviertes Protein C) und die Dissoziation von A2-a2 führen zu Inaktivierung und Abbau des FVIIIa-Trimers (Vehar et al., 1984, Walker et al., 1987, O'Brien et al., 1992)

Die Elektronenmikroskopie ermöglichte erste optische Darstellungen des FVIII. Dieser besteht aus einem globulären ca. 14 nm großen „Kern“ aus HCh und LCh, der 70 Prozent

der Molekülmasse beinhaltet (Mosesson et al., 1990). An diesem hängt als etwa 50 nm langer „Stiel“ die B-Domäne (Fowler et al., 1990).

Ein 3D-Modell der A-Domänen wurde durch den Vergleich mit der Struktur des homologen kristallinen Ceruloplasmin (Pemberton, 1997) berechnet. In vitro Expression und Kristallisation ermöglichten eine räumliche Darstellung der C2-Domäne (Pratt et al., 1999).

1.2.3 Mutationen im FVIII-Gen und ihre Konsequenzen auf Proteinebene

Wie in 1.2.2 aufgezeigt, ist die Struktur des FVIII-Proteins mit seinen zahlreichen posttranslationalen Modifikationen überaus komplex. Viele Studien belegen, dass fast jede Veränderung des FVIII-Proteins mit einer Verringerung von Expression und/oder Aktivität einhergeht, und dass es im FVIII-Gen angesichts der Länge überraschend wenige Polymorphismen gibt (Bowen, 2002). Eine umfangreiche Datenbank mit FVIII-Mutationen und weiteren Informationen findet sich im Internet unter „<http://europium.csc.mrc.ac.uk>“ und zeigt, wie extrem divers die molekulare Basis der Hämophilie A ist (HAMSTeRS: Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site; Kembell-Cook et al., 1998).

Mutationen können das Proteinerückgrat des FVIII auf der Ebene der Aminosäuresequenz und auf der Ebene der proteolytischen Prozessierung ebenso verändern, wie das Glykosylierungs- und Sulfatierungsmuster. Intrazellulär kann dies die Wechselwirkungen mit Proteinen wie Chaperonen stören, die Voraussetzungen für die FVIII-Ausschleusung sind. Außerhalb der Zelle können veränderte Bindungsaffinitäten für andere Plasmaproteine oder für Phospholipide zu Instabilität (fehlende Bindung an VWF) und verminderter Gerinnungsaktivität führen (Modifikation der Bindung an FIXa, FX, Thrombin und Phospholipiden) (Saenko et al., 2002).

Mutationen im FVIII-Gen sind bei etwa zwei Dritteln der Patienten vererbt und bei den restlichen Patienten Spontanmutationen, die häufig während der Gametenbildung des Vaters auftreten (Oldenburg et al., 1993; Rossiter et al., 1994). Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die Art der bisher beschriebenen Mutationen und deren Konsequenzen für die Patienten gegeben werden (Antonarakis, 1998 und Bowen, 2002):

(I) Inversionen

Bei 25% aller Hämophilie A-Patienten und über 40% bis 50% der Patienten mit schwerer Hämophilie A findet man eine große Inversion innerhalb des X-Chromosoms, die durch homologe Rekombination zwischen int22h-1 in Intron 22 und int22h-2 bzw. int22h-3 entsteht (Lakich et al., 1993). Das FVIII-Gen bis Intron 22 ist invertiert, so dass nur verkürzte mRNA-Transkripte entstehen können.

(II) Große Deletionen

Etwa 5% - 10% der Patienten besitzen große Deletionen von mehr als 100 bp im FVIII-Gen, die fast immer eine schwere Hämophilie zur Folge haben.

(III) Kleine Deletionen/Insertionen

Kleine Deletionen und Insertionen von oft nur 1-10 bp führen bei 5% - 10% der Hämophilie A-Patienten zu Verschiebungen des Leserasters bei der Transkription und sind somit häufig Ursache für eine schwere Hämophilie.

(IV) Punktmutationen

Punktmutationen sind die häufigsten Gendefekte bei Hämophilie A-Patienten. Die Hälfte dieser Hämophilie A-Patienten hat FVIII-Gene, in denen lediglich ein Nukleotid mutiert ist. Dies bedeutet in den meisten Fällen einen Austausch von einer Aminosäure (Missense-Mutation), der je nach Position zu leicht verringerten Aktivitäten des Proteins und in der Folge zu leichter oder mittelschwerer Hämophilie führen kann oder zu inaktivem FVIII-Protein oder gar einem Verlust der Expression. Im Falle von Nonsense-Mutationen entsteht in der kodierenden Sequenz ein Stop-Kodon, das in der Regel in der vorzeitigen Terminierung der mRNA und schwerer Hämophilie resultiert (oder selten nur zum Fehlen des mutierten Exons; Dietz et al., 1993). Eine dritte und seltene Gruppe von Mutationen durch Austausch eines Nukleotids besteht in Mutationen, die sich in Spleißdefekten manifestieren.

(V) Seltene Mutationen

Darüber hinaus gibt es Mutationen, die nur bei wenigen Patienten gefunden wurden. Die wichtigsten Mechanismen sind hier Insertion von Retrotransposons (Kazazian et al., 1988), Duplikation von Intron- oder Exonsequenzen (Gitschier, 1988) und Translokation (Migeon et al., 1993).

Die Art der Mutation beeinflusst jedoch nicht nur den Schweregrad der Hämophilie, sondern bedingt auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von inhibitorischen Antikörpern durch den Patienten während der Substitutionstherapie (Schwaab et al., 1995). Nicht nur die Form der Mutation, auch ihre Lokalisation im Faktor VIII-Gen hängt mit der Prävalenz der Inhibitorbildung zusammen. Vereinfacht lässt sich sagen, dass Mutationen, die zum völligen Verlust des Genprodukts und damit zur Abwesenheit von FVIII im Plasma führen, mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit zur Inhibitorbildung führen (35-40%) als Mutationen, in denen FVIII in verringerter Menge, in trunkierter Form oder nur mit einer leichten Konformationsänderung vorliegt (5-10%) (Oldenburg et al., 2000). Die genaue Kenntnis der Mutation lässt jedoch noch keine zuverlässige Prognose über eine mögliche Immunreaktion

des Patienten zu, so dass neben der Analyse potentiell immunreaktiver B- und T-Zell-Epitope des FVIII-Proteins (Lollar, 1999; Reding et al., 1999) auch Zusammenhänge mit anderen Genloci wie z. B. dem MHC-Locus untersucht werden (Hay et al., 1997; Gill, 1999).

1.3 Komplikationen einer Behandlung der Hämophilie A

Der Einsatz von aus Spenderblut gewonnenen Präparaten führte bei einer großen Zahl von Patienten zur Übertragung viraler Krankheiten wie Hepatitis und AIDS. Aufgereinigtes FVIII wird hierbei aus gepooltem Plasma von tausenden Spendern isoliert. In den 80er Jahren stand deshalb neben der weiteren Aufreinigung des Anti-hämophilen-Faktors (AHF), zunächst der Ausschluss bzw. die Inaktivierung von Viren im Fokus der Hämophilie-Forschung. Es wurden verschiedene Techniken entwickelt, wie Ultrafiltration und Affinitätschromatographien sowie die Behandlung mit Lösungsmitteln und Detergentien, Pasteurisierung, Hitzeinaktivierung und Dampfinaktivierung. Die Virusübertragung wurde durch diese Verfahren für die bisher bekannten humanpathogenen Viren auf ein minimales Restrisiko reduziert.

Nach heutigem Kenntnisstand sind aufgrund der verwendeten Screening- und Virusinaktivierungsmethoden von Spenderblut Infektionen mit viralen Erregern wie HBV, HCV und HIV durch Blutprodukte wie Faktor VIII-Konzentrate in den Industrieländern nahezu ausgeschlossen (Teitel, 2000; Evatt et al., 2002; Roth & Seifried, 2002). Ob durch Albumin in FVIII-Konzentraten aus Plasma oder in rekombinanten Produkten spongiforme Enzephalopathien wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung übertragen werden können, ist bis heute noch nicht nachgewiesen (Evatt et al., 2002; Farrugia, 2002). Anders ist die Situation in Entwicklungs- und Schwellenländern, in denen mangelnde finanzielle Ausstattung der nationalen Gesundheitssysteme eine optimale Versorgung der Patienten mit FVIII-Konzentraten unmöglich macht; vielfach werden noch Kryopräzipitate und Frischplasma eingesetzt (Srivastava, 1999). Gerade angesichts der oft hohen Prävalenzen von HBV, HCV und HIV ist somit das Risiko einer Infektion des Patienten deutlich höher. Durch den allgemeinen Gebrauch von rekombinanten FVIII-Präparaten, die keine menschlichen und nur noch Spuren von tierischen Proteinen enthalten, sollte es möglich sein, das Restrisiko der Übertragung bekannter oder noch nicht charakterisierter humanpathogener Erreger weiter zu minimieren (Mannucci & Giangrande, 2000). Die hohen Kosten von Plasma-FVIII-Konzentraten und rekombinanten Produkten führen derzeit noch dazu, dass nur etwa 25% der Hämophilie A-Patienten weltweit adäquat behandelt werden können (Antunes, 2002; Key 2004).

Aus den genannten Gründen ist die Entstehung von Antikörpern (Hemmkörper), als eine weitere Nebenwirkung bei der Behandlung von Hämophilie A-Patienten heute näher in den Mittelpunkt der Forschung gerückt (Lollar, 2004). Die Ausbildung inhibitorischer Allo-Antikörper (Inhibitoren) gegen FVIII-Epitope, durch den Empfänger, wurde zum ersten Mal 1966 beschrieben (Bidwell, 1966). Danach treten bei etwa jedem vierten der mit FVIII-Präparaten behandelten Patienten, Antikörper auf (Ehrenforth et al. 1992; Hoyer & Scandella, 1994). In den ersten 50 bis 100 Tagen nach einer Gerinnungsfaktorapplikation kommt es häufig zu einer Entwicklung von Antikörpern. In dieser Periode geht man von einem erhöhten Risiko aus. Im Gegensatz zu der Situation bei Patienten mit schwerer Hämophilie A, ist die Antikörperentwicklung bei Patienten mit leichter Hämophilie selten (FVIII: 1% zu 40%) (Lusher et al., 1993). Die Effizienz der FVIII-Substitutionstherapie ist mit zunehmendem Inhibitortiter deutlich geringer (Gilles et al., 1997). Die Ausbildung von Inhibitoren führt zu einer Hemmung der substituierten FVIII-Aktivität und verringert dadurch die Behandlungsmöglichkeiten (Lacroix-Demazes et al., 2002). In solchen Fällen müssen entweder erhebliche Mengen an FVIII gegeben werden, um den FVIII-Plasmaspiegel merklich zu erhöhen, oder es muss auf FVIII-unabhängige Therapiemöglichkeiten zurückgegriffen werden. Wichtige Therapieoptionen bei akuten Blutungen von Patienten mit hohem Inhibitortiter bestehen in der Gabe von aktivierten Prothrombin-Komplex-Konzentraten aus Humanplasma (Roberts, 1999), porzinem FVIII (Gatti & Mannucci, 1984) oder rekombinantem FVIIa (Ingerslev et al., 1999; Roberts, 1999; Brackmann et al., 2000). Dies führt zu einem erheblich höheren finanziellen Aufwand für die Therapie, da erst durch höhere FVIII-Mengen eine akute Blutung gestoppt werden kann. Der Inhibitorbildung wird durch die so genannte Immun-Toleranz-Therapie (ITT) entgegengesteuert, bei der durch sehr hohe FVIII-Konzentrationen eine Toleranz des Immunsystems induziert werden kann. Auch bei dieser Behandlung entstehen ebenfalls sehr hohe Kosten. Bei etwa 70% aller Patienten kann eine Immuntoleranz gegen FVIII induziert werden, so dass die Antikörper verschwinden (DiMichele et al., 2002). Weiterhin zeigen gesicherte Einschätzungen, dass eine Rate von fast 100% erreicht werden könnte, wenn die ITT für eine verlängerte Therapiedauer fortgesetzt würde (Mariani et al., 1999). Das erste Protokoll (das „Bonn-Protokoll“ von Brackmann & Gormsen, 1977) bestand in der Infusion extrem hoher FVIII-Mengen über einen Zeitraum von mehreren Monaten. Dieses Protokoll wurde unter anderem von Nilsson und Kollegen („Malmö-Protokoll“; Nilsson et al., 1988) durch vorangehende Immunadsorption der Inhibitoren und kombinierte Gabe von FVIII, Cyclophosphamid und Immunglobulinen modifiziert.

Weiterhin ist auch das spontane Auftreten von Auto-Antikörpern mit einer jährlichen Inzidenz von 0,2-1 pro eine Millionen Menschen beschrieben (Cohen & Kessler, 1996) mit einer hohen Mortalität von 15-22% der Betroffenen (Green & Lechner, 1981; Kessler & Ludlam, 1993). Bei dieser Form der erworbenen Hämophilie A, insbesondere bei älteren Menschen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Frauen unmittelbar nach der Geburt, kann mit den gleichen Protokollen zur Induktion von Immuntoleranz gearbeitet werden (Boggio & Green, 2001).

1.3.1 Klassifikation von FVIII-Antikörpern

FVIII-Antikörper werden unterschieden in Inhibitoren, die die biologische Aktivität (FVIII:C) hemmen, und Nicht-Inhibitoren, die zwar an FVIII binden aber FVIII:C nicht hemmen. Jeder Inhibitorpatient besitzt sein eigenes Profil aus mehrheitlich nicht-inhibierenden und inhibierenden Antikörpern (Gilles et al., 1993). Der Nachweis aller FVIII-Antikörper im Plasma erfolgt durch Immunassays, während der so genannte Bethesda-Assay bzw. dessen Nijmegen-Modifikation nur funktionell hemmende Antikörper erfasst (Kasper et al., 1975, Verbruggen et al., 1995). Im Bethesda-Assay werden gleiche Volumina Normalplasma mit 1 Einheit pro ml und Inhibitor-Plasma verschiedener Verdünnung für zwei Stunden inkubiert und die Reduktion von FVIII:C bestimmt. Eine Halbierung entspricht einer Bethesda Einheit (BU). Patienten die mehr als 1 BU - in manchen Publikationen mehr als 0,5 BU - aufweisen, werden als Inhibitor-Patienten klassifiziert. Auch die *in vitro* nicht inhibierenden Antikörper können *in vivo* einen Einfluss auf FVIII:C haben, da sie theoretisch die „clearance“ aus dem Kreislauf beschleunigen können (Nilsson et al., 1990).

Bei Inhibitoren unterscheidet man Allo-Antikörper, die nach Behandlung mit FVIII-Konzentraten entstehen, und Auto-Antikörper, die zu einer spontanen Hämophilie bei vorher unauffälligen Patienten führen. Bis zu 50% der Allo-Antikörper verschwinden spontan bei der Fortführung der Behandlung (transiente Inhibitoren) (Bray et al., 1994). Andauernd Inhibitor bildende Patienten (persistente Inhibitoren) werden per Definition nach dem Inhibitor-Titer in „low responder“ (< als 5 BU) und „high responder“ (\geq 5 BU) unterteilt (Großmann et al., 1999). In angelsächsischen Ländern liegt diese Grenze bei 10 BU. Der Titer bei „high responder“-Patienten steigt nach wiederholten FVIII-Gaben meist rasch an („anamnestic response“), und ab einem Titer von mehr als 5 BU ist es kaum noch möglich, die Antikörper mit einer FVIII-Dosissteigerung abzusättigen. Die FVIII-Konzentration im Blut reicht für die plasmatische Gerinnung nicht mehr aus, so dass alternative Behandlungsstrategien eingesetzt werden müssen (Lollar, 1997).

Die Reaktion des menschlichen Immunsystems gegen FVIII ist heterogen. Die untersuchten Hemmkörper sind meist Immunglobuline der Klasse G, es wurden aber auch Immunglobuline der Klasse IgM und IgA nachgewiesen (Fulcher et al., 1987, Gilles et al., 1993, Mondorf et al., 1995). Die gebildeten Hemmkörper sind weder präzipitierend noch aktivieren sie das Komplementsystem (Schwarz, 1996).

1.3.2 Mechanismen der FVIII-Inhibition

Grundsätzlich kann man für die inhibitorische Wirkung der FVIII-Antikörper zwei Mechanismen differenzieren: Die Induktion einer Inaktivierung des FVIII oder eine sterische Blockade funktioneller Epitope. Eine FVIII-Proteolyse, die durch Alloantikörper katalysiert wird, konnte *in vitro* nachgewiesen werden (Lacroix-Desmazes et al., 1999). Aufgereinigte IgG-Fractionen von Inhibitorpatienten katalysierten eine Proteolyse von rFVIII zwischen den Domänen A1 und A2 (AS372-373), am N-Terminus der A3-Domäne (AS1680-1681) und innerhalb der A3-Domäne (AS1794-1795). Eine Zugabe von VWF konnte die Hydrolyse reduzieren.

Die sterische Blockade funktioneller Epitope ist detaillierter untersucht; durch die Konstruktion von rekombinanten FVIII-Fragmenten konnte sowohl die Spezifität der Inhibitoren als auch ihre Wirkung charakterisiert werden. Während für Auto-Inhibitor-Patienten meist nur eine Inhibitor-Spezifität nachgewiesen werden konnte, war die Inhibitor-Aktivität bei Allo-Inhibitor-Patienten additiv auf mehrere Epitope verteilt (Scandella, 1999). Die bei betroffenen Patienten am häufigsten nachgewiesenen Hemmkörper richten sich gegen die funktionellen Regionen der Epitope: C2, A2 und A3 (Scandella, 2002).

Ein Vergleich unter verschiedenen FVIII-Konzentraten in der Substitutionstherapie von FVIII „Knock-out“-Mäusen konnte zeigen, dass Präparate, in denen kein oder weniger VWF substituiert war, höhere Inhibitortiter induzierten. Diese Ergebnisse belegen den modulierenden Einfluss von VWF auf die immunogene Aktivität von FVIII (Behrmann et al., 2002).

Inhibitoren der C2-Domäne

C2-spezifische Antikörper können die Bindung des FVIII an den VWF blockieren, eine Stabilisierung verhindern und die FVIII-„clearance“ erhöhen (Shima et al., 1993, Jacquemin et al., 1998). Eine direkte funktionelle Hemmung erfolgt durch das Blockieren der membranbindenden Sequenz oder durch die Reduktion der Dissoziationsrate des VWF (Arai et al., 1989, Saenko et al., 1996). In diesem Fall erfolgt die A2-Dissoziation des FVIIIa bevor

die Ausbildung des membrangebundenen Xase-Komplexes (FXa-bildende Komplex der intrinsischen Aktivierung) vollendet ist, da diese durch den VWF verhindert wird.

Inhibitoren der A2-Domäne

Gegen die A2 Domäne gerichtete Inhibitoren beeinflussen die Kofaktor-Funktion des FVIII im Tenase-Komplex (Scandella, 1996). Es kommt zwar zu einer Ausbildung des Komplexes, doch ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Aktivierung von FXa deutlich reduziert (Lollar et al., 1994).

Inhibitoren der A3-Domäne

An die A3-Domäne bindende inhibierende Antikörper wurden ebenfalls nachgewiesen, doch treten sie seltener auf. Sie verhindern die Bindung an FIXa, so dass der Xase-Komplex nicht ausgebildet werden kann (Gilles et al., 1993; Zhong et al., 1998).

Inhibitoren weiterer Domänen bzw. Regionen

Inhibitoren, die die Assoziation von FVIII und VWF blockieren, können neben der C2-Domäne auch gegen die sauren Regionen *a1* und *a3* und gegen C1 gerichtet sein (Lubahn et al., 1989, Foster et al., 1990, Jacquemin et al., 2000).

1.4 Antigenerkennung und Lymphozytenaktivierung

1.4.1. Überblick über die Lymphozytenpopulationen

Immunreaktionen werden durch Leukozyten hervorgerufen, die von Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen. Aus diesen bilden sich polymorphkernige Leukozyten und Makrophagen des angeborenen Immunsystems sowie Lymphozyten des adaptiven Immunsystems. Die nichtadaptive (angeborene) Immunität dient der ersten Abwehrreaktion. Sie kann als älterer Teil des Immunsystems Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und somit auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion geben (Janeway & Medzhitov, 2002). Die adaptive (erworbene) Immunität basiert auf der klonalen Vermehrung von Lymphozyten, die eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen und es dem Immunsystem so ermöglichen, jedes beliebige Antigen zu erkennen. Bei der adaptiven Immunantwort vermehren sich die antigenspezifischen Lymphozyten und differenzieren zu spezialisierten Effektorzellen, die gegen Antigene agieren. Aus der allgemeinen lymphatischen Vorläuferzelle gehen drei Zelllinien hervor:

B-Lymphozyten tragen an ihrer Oberfläche Immunglobuline als Antigenrezeptoren und nehmen spezifische Antigene durch rezeptorvermittelte Endozytose auf, die sie an ihre Oberflächenglobulinrezeptoren gebunden haben. Sie differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper freisetzen.

T-Lymphozyten bilden zwei Klassen mit spezifischen Antigenrezeptoren, von denen eine vor allem aus den zytotoxischen T-Zellen besteht, während die zweite Klasse T-Helfer-Zellen umfasst, die wiederum andere Zellen, wie B-Zellen oder Makrophagen aktivieren.

Die dritte Zelllinie, die sich aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickelt ist die natürliche Killerzelle (NK-Zelle), als Teil des angeborenen Immunsystems. Diese Zellen zirkulieren als große Lymphozyten mit ausgeprägten intrazellulären Granula im Blut. Sie sind darauf spezialisiert veränderte Zellen, zum Beispiel Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen zu erkennen und unschädlich zu machen (Tonn et al., 2001; Berdel et al., 2004).

T-Lymphozyten sind für die Kontrolle von intrazellulären Infektionen von Bedeutung. Einige Bakterien können sich, geschützt durch ihren Aufenthalt in Vesikeln, die nicht mit Lysosomen fusionieren, antibakterieller Reaktionen entziehen. Solche Infektionen können von einem T-Zell-Typ unter Kontrolle gebracht werden, den so genannten T-Helfer1-Zellen (T_H1 -Zellen). Sie aktivieren Makrophagen und veranlassen die Fusion der Lysosomen mit den Vesikeln, die die Bakterien enthalten. Gleichzeitig stimulieren sie andere antibakterielle Mechanismen der Phagozyten. Auch bei der Bekämpfung extrazellulärer Erreger spielen diese T-Zellen eine wichtige Rolle, da sie B-Lymphozyten aktivieren, um erregerspezifische Antikörper zu

produzieren. Diese Aktivierung übernimmt hauptsächlich eine weitere Gruppe von T-Lymphozyten, die so genannten T-Helfer2-Zellen oder T_H2 -Zellen. T_H1 -Zellen und T_H2 -Zellen sind durch die Expression des Zelloberflächenantigens CD4 (cluster of differentiation, CD) charakterisiert (Zinkernagel & Doherty, 1974).

Um eine adaptiven Immunantwort auszuprägen, müssen naive T-Zellen angeregt werden zu proliferieren und zu Zellen differenzieren, die sich an der Konfrontation mit Antigenen beteiligen können (Abbas et al, 1996; Mosmann & Sad, 1996; Woodland & Dutton, 2003).

1.4.2 Antigenerkennung durch T-Zellen - der „major histocompatibility complex“

Alle Reaktionen der T-Zellen beruhen auf Wechselwirkungen mit Zellen, die fremde Proteine enthalten oder präsentieren. Bei den zytotoxischen T-Zellen und den T_H1 -Zellen sind die Proteine ein Produkt der Erreger, die die Zielzelle infiziert haben oder von ihr aufgenommen wurden. Andererseits erkennen T_H2 -Zellen B-Zellen, die ein fremdes Antigen gebunden und über ihre Oberflächenimmunglobuline aufgenommen haben, und treten mit ihnen in Wechselwirkung. Die Antigenerkennung während der adaptiven Immunantwort wird somit durch zwei unterschiedliche Gruppen hochvariabler Rezeptormoleküle vermittelt, nämlich den Immunglobulinen, die auf den B-Zellen als Rezeptoren dienen und den antigenspezifischen Rezeptoren der T-Zellen (Zinkernagel & Hengartner, 2001). In allen Fällen erkennen T-Zellen ihre Zielzellen aufgrund der Peptidfragmente, die von fremden Proteinen stammen und an spezielle Proteine an der Oberfläche spezialisierter Zellen gebunden sind. Die Moleküle, die den T-Zellen Peptidantigene präsentieren, sind membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen mit der Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) kodiert werden. Die Aufgabe der MHC-Moleküle besteht darin, Peptidfragmente zu binden und diese Fragmente auf der Zelloberfläche „zur Schau“ zu stellen, damit der Komplex von geeigneten T-Zellen erkannt wird (Wang & Reinherz, 2001).

Zellen, die Peptide präsentieren werden als antigenpräsentierende Zellen („antigen presenting cells“, APC) bezeichnet und treten gehäuft in den peripheren lymphatischen Organen auf. Die drei wichtigsten Arten dieser Zellen sind die Makrophagen, die dendritischen Zellen und die B-Zellen. Jede Zellart ist darauf spezialisiert, Antigene unterschiedlicher Herkunft zu verarbeiten und in der Folge den T-Zellen zu präsentieren (Rosenthal & Shevach, 1973).

Der Haupthistokompatibilitätskomplex besteht aus einer Gruppe gekoppelter genetischer Loci, die viele der Proteine codieren, die an der Präsentation von Antigenen für T-Zellen

beteiligt sind. Das herausragendste Merkmal der MHC-Gene ist ihr ausgeprägter Polymorphismus, der dazu führt, dass eine antigenpräsentierende Zelle mehrere verschiedene MHC-Proteine auf ihrer Oberfläche exprimiert und somit eine große Zahl unterschiedlicher Peptidantigene binden kann. Eine T-Zelle nimmt ein Antigen als ein Peptid wahr, das an eine bestimmte allele Variante eines MHC-Moleküls gebunden ist. Sie bemerkt dasselbe Peptid jedoch nicht, wenn es mit anderen MHC-Molekülen assoziiert ist. Dieses Verhalten der T-Zellen bezeichnet man als MHC-Abhängigkeit (MHC-Restriktion) (Zinkernagel & Doherty, 1974; Shearer, 1974). Die meisten MHC-Allele differieren untereinander aufgrund multipler Aminosäuresubstitutionen. Diese Unterschiede kommen gehäuft an der peptidbindenden Stelle und in benachbarten Regionen vor, die einen direkten Kontakt mit dem T-Zell-Rezeptor eingehen (Perham et al., 1995).

Heute kennt man zwei Klassen von MHC-Molekülen (Klasse I und Klasse II), die sich in Feinheiten unterscheiden, aber in Ihren wichtigsten Strukturmerkmalen übereinstimmen. MHC-Moleküle weisen auf der nichtzytoplasmatischen Seite eine peptidbindende Furche auf. Diese äußere extrazelluläre Domäne besitzt dabei die größte Bedeutung. Sie bildet eine lange Spalte, in der Peptidfragmente während der Synthese und des Zusammenbaus der MHC-Moleküle innerhalb der Zelle aufgenommen werden. Das so beladene MHC-Molekül gelangt an die Zelloberfläche, wo der kombinierte Ligand, bestehend aus MHC-Molekül und Peptid den T-Zellen präsentiert wird. Die Antigenrezeptoren der T-Zellen sind darauf spezialisiert, Peptidfragmente von fremden Antigenen zu erkennen, die an ein MHC-Molekül gebunden sind.

Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus zwei Polypeptidketten. Die eine α - oder schwere Kette ist im MHC codiert, die kleinere nichtkovalent angelagerte Kette, das β_2 -Mikroglobulin ist nicht im MHC codiert. Nur die Klasse-I- α -Kette durchdringt die Zellmembran. Das Molekül besitzt vier Domänen. Drei bilden die α -Kette, eine trägt das β_2 -Mikroglobulin bei. Das markanteste Merkmal der MHC-Moleküle ist jedoch die Struktur der α_1 - und α_2 -Domänen, die ein Paar bilden und so einen Spalt an der Oberfläche des Moleküls schaffen, die peptidbindende Region (Bjorkman & Perham, 1990). MHC-Klasse-II-Moleküle bestehen aus einem nicht-kovalentem Komplex zweier Ketten, α (α_1 und α_2) und β (β_1 und β_2), die beide die Membran durchdringen (Jones, 1997) (Abb. 1.5).

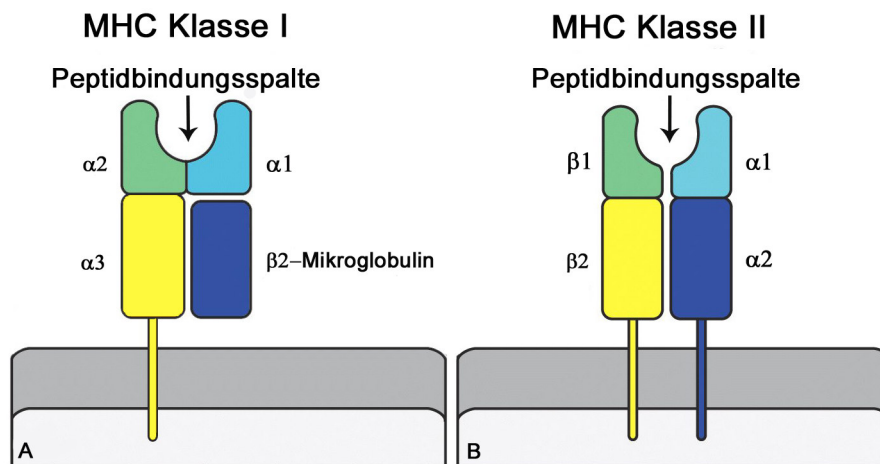


Abb. 1.5. Schematische Darstellung der Struktur von MHC Klasse I und MHC Klasse II. Bild A: Ein MHC-Klasse-I-Molekül bestehend aus den α_1 , α_2 , α_3 -Untereinheiten der schweren Kette und der nichtkovalent assoziierten Untereinheit β_2 -Mikroglobulin. Die Membranbindung findet über die Untereinheit α_3 statt. Die Bindungsspalte wird von den Untereinheiten α_1 und α_2 gebildet. Bild B: Ein MHC-Klasse-II-Molekül bestehend aus den zwei nichtkovalent assoziierten membrangebundenen Ketten α_2 und β_2 , die beide aus je zwei Untereinheiten aufgebaut sind. Die Bindungstasche wird von den Untereinheiten α_1 und β_1 gebildet (nach Janeway, 2005).

Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden MHC-Molekülen besteht darin, dass die Enden des Spaltes bei den MHC-II-Molekülen weiter geöffnet sind. Dies hat zur Folge, dass die Enden von Peptiden, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind, größtenteils im Inneren liegen (Brown et al., 1993; Fremont et al., 1996a). Bei einem MHC-Klasse-I-Molekül umgeben die beiden α -Helices der α_1 - und der α_2 -Domäne das gebundene Peptid. Beim MHC-Klasse-II-Molekül wird das Peptid in ähnlicher Weise von den α -Helices der α_1 - und der β_1 -Domäne festgehalten (Fremont et al., 1996b) (Abb. 1.6).

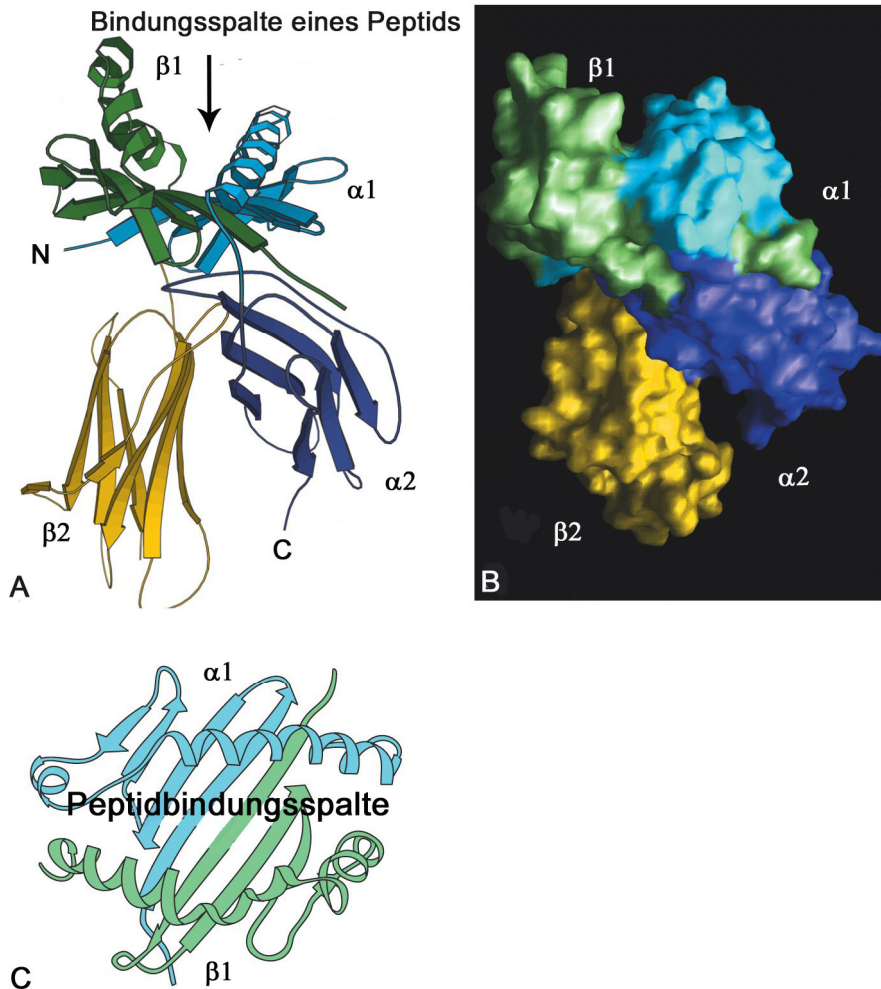


Abb. 1.6. Banddiagramm in dreidimensionaler Struktur eines humanen MHC-Klasse-II-Moleküls (Bild A), computergraphische Darstellung eines von der Zelloberfläche gelösten humanen MHC-Klasse-II-Moleküls (Bild B), Banddiagramm eines humanen MHC-Klasse-II-Moleküls mit Blick von oben (Bild C). Bild A und B: Dargestellt sind die zwei Polypeptidketten α und β . Jede Kette besteht aus zwei Domänen α_1/α_2 und β_1/β_2 . Durch einen schwarzen Pfeil ist die Bindungsstelle eines Peptids angedeutet. Bild C zeigt in der Aufsicht die Peptidbindungstasche, die durch die Faltung der α_1 - und β_2 -Polypeptidkette gebildet wird (nach Janeway, 2005).

MHC-I- und MHC-II-Moleküle werden von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert. Der Umfang der grundlegenden Expression variiert jedoch zwischen den einzelnen Zelltypen. Alle kernhaltigen Zellen tragen an ihrer Oberfläche MHC-Klasse-I-Moleküle.

MHC-II-Moleküle werden auf der Oberfläche von B-Zellen, Makrophagen, anderen antigenpräsentierenden Zellen und epithelialen Zellen des Thymus exprimiert (Steimle et al., 1994).

1.4.3 Antigenverarbeitung und Präsentation

Weitere wichtige Unterschiede zwischen den Molekülen der beiden MHC-Moleküle bestehen nicht nur in Ihrer Struktur, sondern auch in der Herkunft der Peptide, die sie an die Zelloberfläche transportieren. MHC-Klasse-I-Moleküle nehmen Peptide von Proteinen auf, die im Zytosol durch einen multikatalytischen Proteasekomplex (Proteasom) abgebaut werden (Lehner & Cresswell, 1996). Sie können also Fragmente von externen Proteinen an der Zelloberfläche präsentieren (York & Rock, 1996). MHC-Klasse-II-Proteine binden Peptide von Proteinen in membranumschlossenen Vesikeln innerhalb der Zelle; sie präsentieren Peptide, die in Vesikeln der Makrophagen organisiert sind oder die von Phagozyten bzw. B-Zellen aufgenommen wurden. In den Vesikeln sind die Proteine für das Proteasom nicht erreichbar, sie werden stattdessen durch Proteasen der Vesikel zu Peptidfragmenten abgebaut, die an die MHC-II-Moleküle binden. Proteine, die an die Oberflächenimmunglobuline (Antigenrezeptoren) der B-Zellen binden und die diese durch rezeptorvermittelte Endozytose aufnehmen, werden genauso verarbeitet. MHC-II-Moleküle werden zu diesen speziellen Vesikeln (Endosomen) geleitet und nehmen dort das zu präsentierende Peptid auf (Lennon-Dumenil et al., 2002). Da die Erzeugung von Peptiden aus einem intakten Antigen eine Veränderung des nativen Proteins darstellt, spricht man dabei im Allgemeinen von der Antigenverarbeitung. Das Vorzeigen des Peptids an der Zelloberfläche bezeichnet man als Antigenpräsentation.

Sobald die MHC-Moleküle beider Klassen mit den gebundenen antigenen Peptiden die Zelloberfläche erreicht haben, werden sie von funktionell unterschiedlichen T-Zell-Klassen erkannt. MHC-I-Moleküle werden von zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ -T-Zellen) kontaktiert, die die infizierte Zelle bei Bedarf durch weiter unten aufgeführte Mechanismen inaktivieren. T_H1 - oder T_H2 -Zellen ($CD4^+$ -T-Zellen) erkennen dagegen MHC-II-Moleküle (Morrison et al., 1986). MHC-Moleküle der Klassen I und II binden Peptide als integralen Bestandteil ihrer Struktur; ohne Peptid sind sie instabil. Diese feste Bindung ist wichtig, da es sonst an der Zelloberfläche zu Peptidaustauschen kommen würde. Aus der Struktur des Peptid:MHC-Komplexes (Abb. 1.7) ist ersichtlich, dass das Peptid in der dreidimensionalen Struktur des MHC-Moleküls richtig eingeschlossen ist.

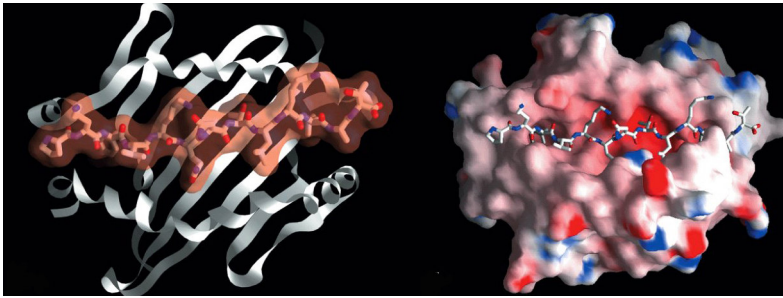


Abb. 1.7. Das MHC-Klasse-II-Molekül bindet Peptide innerhalb der Peptidbindungsspalte. Das gebundene Peptid liegt fest eingeschlossen in einer ausgestreckten Konformation im Peptidbindungsspalt des MHC-Moleküls. Die Enden des Peptids sind nicht fest gebunden und können über den Rand der Bindungsfurche hinaus ragen (nach Janeway, 2005).

Darüber hinaus lässt sich zeigen, dass Peptid-MHC-Komplexe, die auf lebenden Zellen exprimiert werden, mit der gleichen Geschwindigkeit verloren gehen wie das MHC-Molekül selbst. Das weist darauf hin, dass die Bindung im Wesentlichen irreversibel ist. T-Zellen reagieren immer auf kurze, zusammenhängende Aminosäuresequenzen, die in der nativen Struktur von Proteinen häufig verborgen sind. Sie erkennen stimulierende Peptide nur dann, wenn diese an das passende MHC-Molekül gebunden sind (Fremont et al., 1992).

Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, sind gewöhnlich acht bis zehn Aminosäuren lang. Die Interaktion wird durch Kontakte zwischen Atomen des freien Amino- und Carboxylendes des Peptids und invarianten Bereichen der Peptidbindungsfurche, die bei allen MHC-Molekülen vorhanden sind, stabilisiert. Die endständige Aminogruppe des Peptids tritt mit einem unveränderlichen Bereich an einem Ende der Peptidsbindungsfurche in Wechselwirkung, die endständige Carboxylgruppe bindet am anderen Ende der Furche. Das Peptid liegt entlang der Furche in einer ausgestreckten Konformation (Rock & Goldberg, 1999).

Die Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle unterscheidet sich von der Bindung der Peptide an MHC-Klasse-I-Moleküle. Peptide, die an MHC-Klasse-II-Moleküle binden, sind mindestens 13 Aminosäuren lang oder wesentlich länger. Die Gruppen von Aminosäuren, die bei MHC-I-Molekülen die beiden Enden der Peptide binden, kommen bei MHC-II-Molekülen nicht vor und die Enden der Peptide werden nicht gebunden. Das Peptid liegt stattdessen in einer ausgestreckten Konformation längs der MHC-II-Bindungsfurche (Abb. 1.7). Dort wird es auf zweifache Weise festgehalten. Peptidseitengruppen ragen in flache und tiefe Taschen hinein, die von Aminosäureresten ausgekleidet sind, die zwischen MHC-II-Molekülen variieren. Außerdem wird das Peptidrückgrat von Seitengruppen konservierter Aminosäurereste gebunden, die alle MHC-II-Bindungsfurchen auskleiden. Dadurch, dass das Peptidrückgrat gebunden wird und das Peptid an beiden Seiten der Bindungsfurche herausragen kann, gibt es im Prinzip keine Längenbegrenzung für die

Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden. Längere Peptide werden jedoch anscheinend in den meisten Fällen von Peptidasen auf eine Länge von 13 bis 17 Aminosäuren verkürzt (Rudensky et al., 1991; Rammensee, 1995).

1.4.4 Der T-Zellrezeptorkomplex und kostimulierende Oberflächenmoleküle

Jeder Lymphozyt besitzt einen Rezeptor, der für ein bestimmtes Antigen spezifisch ist. Zusammengenommen sind die Rezeptoren aller unterschiedlichen Lymphozyten in der Lage, eine große Vielzahl von Antigenen zu erkennen. Der T-Zell-Rezeptor ist mit einem Komplex unveränderlicher Proteine assoziiert, die für die Signalübertragung erforderlich sind. Mit Hilfe von Antikörpern gegen T-Zellrezeptoren (T-cell-receptor, TCR) ließ sich zeigen, dass jede T-Zelle etwa 30000 Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche trägt; dieser Rezeptor besteht aus acht Polypeptidketten. Zwei dieser heterogenen Polypeptidketten, die so genannten T-Zellrezeptor- α - oder β -Ketten durchdringen die Lipiddoppelschicht der Zellmembran mit einer hydrophoben Transmembrandomäne und enden mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Beide Ketten weisen an jeder Domäne Kohlenhydratseitenketten auf (Bentley & Mariuzza, 1996), wobei der äußere Teil jeder Kette aus zwei Domänen besteht, die einem membrangebunden Fab-Fragment von Immunglobulinen der B-Zellen sehr ähnlich sind (Yanagi et al., 1984; Al-Lazikani et al., 2000). Dieses Heterodimer ist durch eine Disulfidbrücke verknüpft. Jede Kette enthält eine konstante Immunglobulindomäne und eine variable Domäne. Die variable Domäne bildet die Antigenbindungsstelle. Auch die beiden Ketten des TCR sind durch Disulfidbrücken verknüpft, ihre beiden Domänen ähneln der konstanten und variablen Immunglobulindomäne. Die beiden variablen Regionen des TCR bilden die Antigenerkennungsstelle. Die Gene für die α - und die β -Kette des T-Zellrezeptors bestehen aus getrennten Segmenten, die während der Entwicklung der T-Zelle durch somatische Rekombination verknüpft werden. Diese Rekombination der Keimbahn-DNA gewährleistet die Vielfalt des T-Zell-Rezeptors in seinem zentralen Bereich der Antigenerkennung (Sim et al., 1984; Bentley et al., 1995; Fields et al., 1995). T-Zellrezeptoren unterscheiden sich von B-Zellrezeptoren dadurch, dass der T-Zellrezeptor monovalent ist, während Immunglobuline bivalent sind, außerdem wird der T-Zellrezeptor niemals sezerniert, während Immunglobuline bei einer B-Zellaktivierung sezerniert werden können.

Vier andere Polypeptidketten (CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ), die zusammen als CD3-Komplex bezeichnet werden sind mit dem TCR-Heterodimer an der Zelloberfläche stabil verbunden. Diese CD3-Ketten geben zusammen mit einem an den TCR assoziiertem Homodimer aus ζ -Ketten der Zelle ein Signal, wenn der TCR seinen Peptid:MHC-Liganden gebunden hat

(Malissen & Malissen, 1996). Der Ligand des T-Zellrezeptors ist immer ein MHC-Molekül. Die T-Zellrezeptoren besitzen aus diesem Grunde eine verhältnismäßig unveränderliche Form. Die Variabilität richtet sich daher auf das gebundene Peptidantigen im Zentrum der Oberfläche, die mit dem Rezeptor in Kontakt tritt (Garcia et al., 1996).

Bei der Wanderung der naiven T-Zellen durch die Lymphknoten und ihren ersten Interaktionen mit antigenpräsentierenden Zellen spielen Adhäsionsmoleküle auf den Zelloberflächen eine wichtige Rolle. Diese Bindungsreaktionen werden von einem variierenden Angebot an Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der T-Zelle kontrolliert, das eine komplementäre Anordnung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen erkennt (Underhill et al., 1999).

Die vorübergehende Bindung naiver T-Zellen an professionelle antigenpräsentierende Zellen ist wichtig, damit die T-Zellen ausreichend Zeit haben, um viele MHC-Moleküle auf das Angebot spezifischer Peptide auf der Oberfläche jeder antigenpräsentierenden Zelle prüfen zu können. Bei einer passenden Bindung zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplex kommt es zu Konformationsänderungen dieser Adhäsionsmoleküle, die die Bindung der Zellen zueinander verstärken und den Kontakt verlängern (Bromley et al., 2001; Friedl & Brocker, 2002; Montoya et al., 2002). Bei einer antigenspezifischen Bindung wird das Zytoskelett der T-Zelle auf den Bereich der Zellinteraktion ausgerichtet, um die Freisetzung von Effektormolekülen, die aus dem Golgi-Apparat kommen, gezielt auf die antigenpräsentierende Zelle zu konzentrieren (Acuto & Cantrell, 2000).

Zur Aktivierung von naiven T-Zellen ist das Erkennen von fremden Peptidfragmenten, die an ein MHC-Molekül gebunden sind, erforderlich. Dies Erkennen reicht aber nicht aus, denn für eine T-Zellaktivierung werden Oberflächenproteine auf der T-Zelle sowie gleichzeitig ein kostimulierendes Signal von einer spezialisierten antigenpräsentierenden Zelle benötigt. Nur diese Zellen sind in der Lage, neben den beiden Klassen von MHC-Molekülen auch die kostimulierenden Oberflächenmoleküle zu exprimieren, die es ihnen wiederum erlauben, die klonale Expansion der naiven T-Zellen und deren Differenzierung zu steuern (Lanzavechia & Sallusto 2001). Antigenerkennung ohne kostimulierendes Signal inaktiviert naive T-Zellen und führt zu einem anergischen Zustand (Lenshow et al., 1996).

Die Oberflächenproteine CD4 und CD8 binden seitlich an der Basis der MHC-Klasse-II- bzw. MHC-Klasse-I-Moleküle und unterstützen den T-Zell-Rezeptor-Komplex bei der Signalübertragung, so dass die Empfindlichkeit der T-Zelle für ein Antigen um etwas das 100fache erhöht wird. CD4 und CD8 werden aus diesem Grunde auch als Korezeptoren bezeichnet. Der Korezeptor CD4 liegt als Monomer vor und besteht aus vier

immunglobulinartigen Domänen (D1-D4). Das CD8-Molekül ist ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Heterodimer aus α - und β -Ketten. Jede Kette enthält eine einzelne immunglobulinartige Domäne, die durch ein Stück Polypeptidkette mit der Zellmembran verknüpft ist (Cammarota et al, 1992; König et al., 1992; Zamoyska, 1998).

Die Signalübertragung durch antigenspezifische T-Zellrezeptoren erfordert ihre Aggregation durch eine Reihe von Peptid-MHC-Komplexen auf der Zielzelle. Zu einer optimalen Nachrichtenübermittlung kommt es nur nach einer Komplexbildung des Rezeptors mit den Corezeptoren CD4 und CD8. Die Aggregation des Rezeptors aktiviert die Zelle (Cochrane, 2001). Das geschieht durch Zusammenführen von Tyrosinkinase, die an die zytoplasmatischen Domänen der Corezeptoren gebunden sind, mit ihren Zielregionen in den zytoplasmatischen Domänen des CD3-Rezeptorkomplexes. So wird eine Kaskade von Signalreaktionen ausgelöst, die am Ende zur Aktivierung von Genen führt, die für die Zellproliferation und Differenzierung oder für die Effektorfunktionen der T-Zelle notwendig sind (Cantrell, 1996; Zhang & Samelson, 2000).

1.4.5 Zytokine

Naive CD4-Zellen können sich nach einer Aktivierung entweder zu einer T_H1 - oder T_H2 -Zelle differenzieren, die nach ihrer Stimulierung unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihrer Funktion unterscheiden. Die Entscheidung zur unterschiedlichen Entwicklung naiver CD4-Zellen, fällt bei ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen, wobei die Gründe aus denen sich proliferierende CD4-T-Zellen zu T_H1 - oder T_H2 -Zellen entwickeln, noch weitgehend unbekannt sind. Bisher ist bekannt, dass die Konzentration des Antigens, das Aussehen der Peptid-MHC-Komplexe, die vorherrschenden Kostimulatoren auf den Zelloberflächen, sowie die initial induzierte Zytokinproduktion (IFN- γ , IL-12, IL-4) durch die Pathogene eine Rolle spielen (Constant et al., 1995; Ansel et al., 2003; Holzer et al., 2003; Szabo et al., 2003).

Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die von einer Zelle gebildet werden und das Verhalten oder die Eigenschaften dieser und anderer Zellen verändern. Die meisten von T-Zellen gebildete Zytokine bezeichnet man als Interleukine (IL), ergänzt um eine Zahl. Das im Rahmen einer Immunantwort initial sekretierte Zytokinprofil wird legt fest, welche Form der Immunantwort (zytotoxisch, humoral, zellvermittelt oder allergisch) dominiert. Sobald die drei Typen von T-Zellen ihre Ziele erkennen, werden sie zur Freisetzung verschiedener Effektormoleküle angeregt, die einerseits sich selbst und die Zielzellen direkt beeinflussen, andererseits weitere Effektorzellen hinzuziehen. Zytokine beeinflussen ihre Zellen, indem sie

an spezifische Rezeptoren binden, die meist aus zwei oder sogar drei transmembranösen Polypeptidketten bestehen. Wird eine Rezeptorkette durch die Bindung eines Zytokins aktiviert, kommt es zur Aggregation des Rezeptors. Er veranlasst Signale in die Zelle zu senden, auf der er exprimiert wird. Diese Signale regen Proteinkinasen, die mit den zytoplasmatischen Domänen des Zytokinrezeptors assoziiert sind, dazu an, sich gegenseitig zu phosphorylieren und so zu aktivieren (Rossi & Zlotnik, 2000; Borish et al., 2003; Ono et al., 2003).

Die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen wird durch einen Proteinwachstumsfaktor oder ein Zytokin gesteuert, das man als Interleukin-2 (IL-2) bezeichnet und das von aktivierten T-Zellen selbst gebildet wird. Die erste Interaktion mit einem spezifischen Antigen mit den dazugehörigen kostimulierenden Signalen bewirkt, dass die T-Zelle aus einer ruhenden Phase des Zellzyklus in die G1-Phase des Zellzyklus eintritt (Appleman et al., 2000; Gaffen, 2001). T-Zellen die auf diese Weise aktiviert worden sind, können sich im Verlauf mehrerer Tage zwei- oder dreimal teilen, so dass aus einer Zelle Tausende von Nachkommen entstehen, die alle einen identischen Antigenrezeptor tragen. Nach ungefähr vier bis fünf Tagen schnellen Wachstums fördert IL-2 die Differenzierung dieser Zellen zu Effektorzellen, die alle Proteine synthetisieren können, die für ihre speziellen Funktionen als Helfer- oder zytotoxische T-Zellen nötig sind (Minami et., 1993).

Einer der wichtigsten Unterschiede, der sie von naiven T-Zellen unterscheidet, sind die unterschiedlichen Bedingungen zur Aktivierung der T-Zellen. Wenn eine T-Zelle sich zu einer Effektorzelle entwickelt hat, führt ein späteres Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen zu einer Immunantwort, ohne dass eine Kostimulation erforderlich ist (Gudmundsdottir et al., 1999).

1.4.6 Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

T_H1 -Effektorzellen sekretieren pro-inflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und den Tumornekrosefaktor (TNF). IFN- γ führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und der Mehrexpression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche (Steimle et al., 1994). IFN- γ fördert auch die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und unterstützt die Synthese von komplementbindenden IgG-Subklassen (IgG₁ und IgG₂ in Menschen). IL-2 aktiviert T-Zellen zu einer massiven klonalen Expansion, TNF- β inhibiert B-Zellen und aktiviert Makrophagen. Weiterhin bilden T_H1 -Zellen die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren IL-3 und GM-CFS („Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“), die die Bildung von neuen phagozytischen Zellen im Knochenmark stimulieren. TNF- α und - β (Lymphotoxin), die von den T_H1 -Zellen am Ort der Infektion sezerniert werden, stimulieren hauptsächlich Makrophagen und darüber hinaus auch Endothelzellen in der näheren Umgebung, zur Expression bestimmter Oberflächenproteine, an die sich Phagozyten anlagern können. Diese Mechanismen sorgen für Nachschub an phagozytischen Zellen. Die Aktivierung der Makrophagen ist die hauptsächliche Funktion der T_H1 -Zellen.

Die Haupteffektormoleküle der zytotoxischen T-Zellen sind Zytokine Perforin-1, Granulysin und Granzyme, die die Lipiddoppelschicht der Zellmembran durchdringen und im Falle von Granulysin und Granzyme in der Zelle einen programmierten Zelltod auslösen. Perforin-1 bildet in der Membran der Zielzelle Poren, durch die die Zellhomöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann; Wasser und Salz strömen in die Zelle ein und führen zum schnellen Zelltod (Barry & Bleackley, 2002; Lieberman, 2003). Das wichtigste Zytokin, das von CD8-T-Effektorzellen freigesetzt wird, ist Interferon- γ , das die virale Replikation hemmen oder sogar dafür sorgt kann, dass das Virus aus infizierten Zellen völlig eliminiert wird, ohne diese Zellen zu töten. Nebenbei steigert Interferon- γ auch die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in infizierten Zellen (Shtrichman & Samuel, 2001). Das wichtigste membranassoziierte und mit dem TNF verwandte Molekül, das von zytotoxischen T-Zellen und einigen T_H1 -Zellen exprimiert wird, ist der so genannte Fas-Ligand (CD178), der bei Zellen, die den Fas-Rezeptor besitzen, den Zelltod induzieren kann (Kägi et al., 1994).

Die membrangebundenen Effektormoleküle gehören zur Proteinfamilie der Tumornekrosefaktoren (TNFs). Ihre Rezeptoren auf den Zielzellen gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren (TNFR). TNF- α und - β werden in gelöster und membranassoziiierter Form von T_H1 -, einigen T_H2 - sowie von zytotoxischen T-Zellen gebildet und geben den Makrophagen aktivierende Signale. Auch Makrophagen können im Rahmen einer autokrinen Stimulation TNF- α sezernieren.

Alle drei Klassen von Effektor-T-Zellen exprimieren ein oder mehrere Mitglieder der TNF-Familie, wenn sie spezifische Antigene auf der Zielzelle erkennen. Aufgrund der Aktivierung wird auf der Oberfläche von T-Zellen außerdem ein Molekül der TNF-Familie gebildet, das als CD40-Ligand (CD40L) bezeichnet wird, da es das Oberflächenmolekül CD40 der B-Zelle, Makrophagen, Endothelzellen, dendritische Zellen und Fibroblasten bindet. Die Bindung von CD40-Liganden an CD40 aktiviert die oben genannten Zellen und löst die Expression von weiteren Oberflächenmolekülen aus, die die T-Zellantwort weiter antreiben. Die Bindung von CD40L an die B-Zelle induziert deren Wachstum und im Hinblick auf die Antikörperproduktion einen Isotypenwechsel (Antikörperklassenwechsel) (Stavnazer, 1996). Makrophagen werden bei der Bindung von CD40L an CD40 dazu angeregt TNF- α zu sezernieren und auf geringere Konzentrationen von INF- γ zu reagieren (Grewal & Flavell, 1996; Idriss & Naismith, 2000; Locksley et al., 2001)

Erkennt eine T_H1-Zelle spezifisch ihr Ziel, so wird schnell die Transkription der Zytokingene induziert und die Proteinneusynthese beginnt innerhalb einer Stunde nach Rezeptorstimulierung. Die neu entstandenen Zytokine werden direkt durch Mikrovesikel zur Stelle des Kontaktes zwischen der T-Zellmembran und den Makrophagen transportiert (Shaw & Kamen, 1984). Sind die Makrophagen durch den Zellkontakt mit der T_H1-Zelle bzw. ihrer IFN- γ -Sekretion aktiviert, wird als Folge eine Reihe von biochemischen Prozessen die antigeninaktivierende Wirkungsfähigkeit verstärkt. Die intrazellulären lysosomalen und antibakteriellen Enzyme der Makrophagen arbeiten dadurch noch wirkungsvoller. MHC-Klasse-II-Moleküle, Oberflächenadhäsionsmoleküle sowie Rezeptoren für TNF und CD40 werden vermehrt exprimiert.

1.4.7 Die Aktivierung der humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper vermittelt, die von Plasmazellen sezerniert werden. Bevor die Produktion eines Antikörpers jedoch beginnen kann, muss ein Immunglobulin, das von genau denselben Genen kodiert wird, als Zelloberflächenantigenrezeptor der B-Zelle fungieren. Die Bindung von Antigenen an solche Transmembranimmunglobuline löst als erstes Signal die Aktivierung der B-Zelle aus und damit letztendlich deren klonale Expansion und die Differenzierung der Nachkommenzellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Die membrangebundene und die sezernierte Form eines Immunglobulins, die eine B-Zelle erzeugt, besitzen dieselbe Spezifität. Das Antigen der membrangebundenen Immunglobuline an der Zelloberfläche und die Signalweitergabe durch die Immunglobuline nach der Bindung eines Antigens erfordert die Assoziation der schweren Kette des Immunglobulins mit zwei anderen Membranproteinen, so dass ein Komplex in der Zellmembran entsteht. Die Vernetzung von Komplexen durch Antigene führt zur Aktivierung von Enzymen innerhalb der Zelle, die eine Folge biochemischer Prozesse auslösen, die in der Aktivierung der B-Zelle enden. Zwar können einige Antigene allein durch ihre Bindung an die Oberflächenimmunglobuline B-Zellen aktivieren, aber im Allgemeinen erfordern B-Zell-Reaktionen als zweites Signal ihrer Aktivierung besondere Wechselwirkungen mit T-Helferzellen, speziell mit T_H2 -Zellen (Parker, 1993; Reth, 1995). Das durch die Immunglobuline gebundene Antigen wird in das Zellinnere transportiert und durch Proteasen in Peptidfragmente zerschnitten, die sich mit MHC-Klasse-II-Moleküle verbinden und an der B-Zell-Oberfläche präsentiert werden. (Siemasko & Clark, 2001). Eine Subpopulation der T_H1 -Zellen kann ebenfalls die Aktivierung der B-Zelle unterstützen. Ein weiterer Stimulus, der die Aktivierung der B-Zelle verstärkt, kann durch aktivierte Komponenten der Komplementsystems gegeben werden. Einzelne Komplementfaktoren binden an spezielle Komplementrezeptoren auf der B-Zell-Oberfläche und können so den Effekt des Antigens zusätzlich verstärken (Villiers et al., 2004).

Der Umstand, dass Antikörperreaktionen auf Proteinantigene die Hilfe antigenspezifischer T-Zellen benötigen, um auf dasselbe Antigen zu reagieren, wird als gekoppelte Erkennung (linked recognition). Das bedeutet, dass eine B-Zelle in Gegenwart eines fremden Proteins erst dann angeregt werden kann Antikörper gegen ein bestimmtes Protein zu bilden, wenn eine CD4-T-Zelle, die eine Peptidspezifität aufweist, zur Produktion entsprechender T-Helferzellen aktiviert wurde. Dies setzt aber nicht dieselben zu erkennenden Epitope in dem Protein voraus. Die Antigenrezeptoren der B-Zelle können somit an ganz unterschiedlichen Stellen im Protein binden. B-Zellen, die ein spezifisches Antigen binden, präsentieren auf ihren MHC-Klasse-II-Molekülen Peptidfragmente aus einem Antigen 10000fach effizienter als B-Zellen, die das Antigen nicht über ihre Immunglobulinrezeptoren

binden. CD4-T-Helfer-Zellen unterstützen daher nur B-Zellen, deren Rezeptor das Antigen gebunden hat und diese Proteinfragmente den T-Zellen präsentiert (Parker, 1993; MacLennan et al., 1997).

T_H2-Zellen sekretieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-10. IL-4 aktiviert B-Zellen, fördert die Synthese von nicht-komplement bindenden IgG₄ und IgE beim Menschen und von IgG₁ und IgE bei Maus-Plasmazellen und erhöht die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (Paul, 1990, Constant & Bottomly, 1997). Die T_H1-Zellproliferation wird gestoppt und die Makrophagenaktivierung durch die Suppression von IFN- γ inhibiert (Nelms et al., 1999). IL-5 steigert bei den B-Zellen der Maus die Differenzierung und die Synthese von IgA. IL-10 führt, wie IL-4, zu einem Anstieg der MHC-Klasse-II-Moleküle auf der B-Zelloberfläche. Dagegen bremst es die T-Zellexpansion und die Zytokinausschüttung durch Makrophagen. Das IL-2 und der CD40-Ligand lenken vermutlich zusammen die klonale Expansion, die der Antikörperproduktion vorangeht (Jaiswal & Croft, 1997).

Die primären Maßnahmen zur Aktivierung von B-Zellen durch T_H2-Zellen besitzen eine auffallende Ähnlichkeit mit der Stimulierung von Makrophagen durch T_H1-Zellen. Die infizierten Makrophagen können jedoch direkt nach der Aktivierung das intrazelluläre Pathogen zerstören, während die B-Zellen, genau wie die naiven T-Zellen, sich erst klonal vermehren müssen, bevor sie effektive Antikörper sezernieren. Zusammenfassend ist die T_H1-Zellen-Zytokinproduktion essentiell für eine starke zellvermittelte Immunität und die T_H2-Zytokine sind notwendig, um die Antikörperproduktion durch B-Zellen zu veranlassen (Mosmann & Sad, 1996; Rogmagnani, 1997).

1.4.7 Die Rolle der T-Zellen bei der Induktion von Hemmkörpern gegen FVIII

Die Entwicklung von Inhibitoren ist eine schwere Nebenwirkung in der für die Patienten notwendigen Substitutionstherapie mit FVIII-Konzentraten (siehe 1.3). Die immunologischen Mechanismen, die zu einer Antikörperbildung führen sind auf molekularer Ebene gut beschrieben. T-Zellen spielen wie in Abschnitt 1.4.7 beschrieben eine wichtige Rolle bei der humoralen Antwort auf Proteinantigene. Viele Studien zeigen, dass die Inhibitorbildung bei Hämophilie A-Patienten T-zellabhängig ist. Untersuchungen mit B-zelldepletierten peripheren mononukleären Zellen machten deutlich, dass Induktion und Aufrechterhaltung einer Antikörperantwort gegen FVIII die Beteiligung FVIII-spezifischer T-Zellen erfordert. Hämophilie A-Patienten besitzen T-Zellen, die spezifisch gegen FVIII gerichtet sind (Newton-Nash et al., 1995; Reding et al., 1999). Das Ausmaß der T-zellproliferativen Antwort variiert unter den Hämophiliepatienten und korreliert mit dem individuellen Inhibitortiter (Singer et al., 1996).

Um die Entwicklung von Inhibitoren in der Therapie von Hämophilie A-Patienten besser verstehen zu können, wurde die Immunantwort auf Faktor VIII in einem hämophilen Mausmodell charakterisiert. Nach zwei bis drei intravenösen Injektionen von humanen FVIII sind inhibitorische Antikörper in den therapierten hämophilen Mäusen zu messen (Qian et al., 1999). Es wurde eine klare zeitliche Korrelation zwischen dem Erscheinen von FVIII spezifischen CD4⁺-T-Zellen in der Milz und dem Nachweis von FVIII-Antikörpern im Plasma hämophiler Mäuse beschrieben. In der Arbeit von Sasgary et al. weist vieles daraufhin, dass T_H1-Zellen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunantwort gegen FVIII bei Hämophilie-Mäusen besitzen. IFN- γ produzierende T-Zellen stellen eine dominierende T-Zellsubpopulation dar (Sasgary et al., 2002).

Während die molekularbiologischen Prozesse der Antikörperantwort gegen FVIII bisher sehr gut untersucht sind, ist relativ wenig über die Rolle der T-Zellen in der Entwicklung einer inhibitorischen Antikörperbildung bekannt.

Eine Störung der APC-CD4⁺-T-Zellinteraktion konnte in einer Studie von Qian und Kollegen eine Korrelation zwischen antigenabhängiger CD4⁺-Zellaktivierung und Antikörpersynthese gezeigt werden. Durch die Blockade der Interaktion von CD28 auf T-Zellen mit dem korrespondierenden Oberflächenmolekül B7-2 auf APC konnte die essentielle Antigen spezifische T-Zellantwort, die Hochregulierung der Zytokinexpression, die Förderung der T-Zellexpansion und die Differenzierung unterdrückt werden. Die Entwicklung von FVIII-hemmenden Antikörpern konnte dadurch reduziert werden (Qian et al., 2000). Eine Blockade

der CD40/CD40L-Kostimulation konnte bei einigen Patienten mit Inhibitoren ebenfalls die Entwicklung von Antikörpern ähnlich effektiv reduzieren (Ewenstein et al., 2000). Weiterhin haben Rossi und Kollegen darauf hingewiesen, dass die Regulation von FVIII-Antikörpern in Hämophilie A E16-Knockout-Mäusen sehr komplex ist und T_H1 - und T_H2 -T-Zellen daran beteiligt sind (Rossi et al., 2001).

Ein weiterer Beleg dafür, dass die humorale Antwort gegen substituiertes FVIII-Protein T-zellabhängig ist, lieferten Untersuchungen bei HIV-Patienten, die gleichzeitig an einer Hämophilie erkrankt waren. Die HIV-Infektion führte zum Verschwinden der Inhibitoren bei sinkender T-Helfer-Zellzahl (Bray et al., 1993). $CD4^+$ -T-Zellen erkennen das lineare FVIII-Peptidfragment, präsentiert durch MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen und stimulieren B-Zellen, die initial klonal expandieren und im weiteren Verlauf Antikörper mit hoher Affinität zu FVIII sezernieren. Rekombinantes FVIII und synthetisierte Peptide, die großen Bereichen des FVIII-Proteins gleichen, wurden bisher eingesetzt, um die $CD4^+$ -T-Zell-Antworten sowohl in Hämophiliepatienten, als auch in gesunden Menschen zu untersuchen. Bei gesunden Probanden und Hämophiliepatienten ohne Nachweis von Inhibitoren ist das Ausmaß der FVIII-spezifischen T-Zellproliferation geringer als bei Hämophiliepatienten mit messbaren Inhibitoren. Grundsätzlich können alle Individuen, die $CD4^+$ -T-Zellen besitzen, mit einer Proliferation der $CD4^+$ -T-Zellen auf präsentiertes FVIII reagieren (Reding et al., 1999; Reding et al., 2000). Nicht-inhibierende Antikörper werden bei ungefähr 15-17% der gesunden Blutspender gefunden (Algiman et al., 1992; Gilles et al., 1994; Batlle et al., 1996). Die T-Zellantwort auf die unterschiedlichen Domänen des FVIII-Proteins ist unterschiedlich; bisher wurden T-Zellepitope in den FVIII-Domänen A2, A3, C1 und C2 identifiziert (Reding et al., 2003; Reding et al., 2004; Hu et al., 2004; Jones et al., 2005).

1.5 Tiermodell der Hämophilie A

In vielen Fällen kann man die Funktion von Proteinen nur dann vollständig verstehen, wenn Tiere zur Verfügung stehen, die das zu untersuchende Protein aufgrund einer Mutation im zuständigen Gen nicht fehlerfrei translatieren. Die Zusammensetzung eines Proteins, und damit sein Aufbau, sind in dem jeweiligen Gen kodiert. Die Manipulation des Genoms durch Austausch des Gens durch eine fehlerhafte Kopie, beschreibt das Verfahren des Gen-Knockouts (Gen-KO). Ein Tiermodell wird als hilfreich angesehen, um die menschliche Immunantwort gegen FVIII zu rekonstruieren und zu analysieren.

Als Kleintiermodelle konnten Bi und Kollegen zwei neue Mausstämme generieren, die FVIII nur fehlerhaft synthetisieren können. Dabei wird mittels Insertion eines Neo-Gens an das 3'-Ende von Exon 16 (E-16) und Exon 17 (E-17) des FVIII-Mausgens das Gen verändert. In dem Plasma der betroffenen Mausstämme ist bei relativ mildem Phänotyp keine FVIII-Aktivität mehr messbar. Diese FVIII-KO-Mäuse bilden - wie auch ein Teil der Patienten mit schwerer Hämophilie A - aufgrund ihres intakten Immunsystems inhibitorische Antikörper gegen humanen FVIII. Dennoch sind diese Mäuse gesund, zeigen keine spontanen Blutungsepisoden und bringen gesunde Nachkommen hervor (Bi et al., 1995; Bi et al., 1996; Muchitsch et al., 1999). Dieses Mausmodell kann helfen, die leitenden Faktoren zu untersuchen, die bei der immunogenen Aktivität von FVIII und der Entwicklung einer Immunantwort gegen FVIII von Bedeutung sind.

Durch erste Untersuchungen an Hämophilie A-Knockout-Mäusen konnte die Eignung dieser transgenen Mäuse für Studien zur Analyse der Immunogenität von FVIII gezeigt werden. Nach drei Injektionen von Recombinate[®] bzw. eines mit einem monoklonalen Antikörper gereinigten pdFVIII war sowohl bei den Exon-16-, als auch bei den Exon-17-Knockout-Mäusen eine Antikörperentwicklung nachweisbar (Qian et al., 1999). In immundefizienten Mäusen, wie den SCID-Mäusen (SCID: „severe combined immuno-deficiency“), kann die Expression von FVIII ohne die Induktion einer Inhibitorbildung getestet werden (Bosma & Carroll, 1991). Aufgrund des endogenen FVIII-Spiegels besitzen die Mäuse jedoch keinen Hämophilie-Phänotyp. Die Einkreuzung der FVIII-Disruption in einen immundefizienten Mausstamm demonstrierte, dass eine Kombination aus den Vorteilen beider Modelle möglich ist (Vanden Driessche et al., 1999; Chuah et al., 2003). Die Beobachtung von Hunden mit einem schweren Hämophilie-Phänotyp führte zur Zucht und Charakterisierung verschiedener FVIII-defizienter Hundekolonien (Lozier et al., 2002), so dass auch ein mit Hämophilie A-Patienten vergleichbares Großtiermodell für präklinische Studien verfügbar ist.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die FVIII-Knockout-Maus ein gutes Tiermodell darstellt, um die Antwort des Immunsystems auf T-Zell-Ebene gegen humanen FVIII zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung der T-Zellantwort in hämophilen E17-FVIII-Knockout-Mäusen nach Immunisierung mit FVIII. Etwa 25% der Patienten die an einer schweren Hämophilie leiden, entwickeln als Komplikation einer Substitutionstherapie gegen Faktor VIII gerichtete Antikörper, die die prokoagulatorische Aktivität des FVIII-Proteins neutralisieren. Viele bisher durchgeführte Untersuchungen weisen darauf hin, dass an der Inhibitorbildung T-Zellen beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die vorwiegende Beteiligung von T-Helfer1- (T_H1) bzw. T-Helfer2-Zellen (T_H2) bei dieser Immunantwort durch Untersuchung der exprimierten Zytokinprofile analysiert werden.

Die Stärke einer Restimulation sowie die Frequenz antigenspezifischer $CD4^+$ -T-Zellen aus FVIII-immunisierten hämophilen Mäusen mit FVIII-Protein und FVIII-Peptidfragmente soll untersucht werden, um immunogene Peptidsequenzen in ausgewählten Domänen des FVIII-Proteins zu identifizieren, die im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Mit dem zur Verfügung stehenden hämophilen Mausmodell kann die Immunantwort auf humanes FVIII auf ihrer frühesten Stufe untersucht werden, um so FVIII-Sequenzen zu identifizieren, die T-Zellen als Epitope dienen und eine bedeutende Rolle bei der Inhibitorsynthese spielen könnten. Die *ex vivo* Identifikation und Charakterisierung der T-Zellepitope soll mit Hilfe einer generierten FVIII-Peptidbibliothek und FVIII-spezifische $CD4^+$ -T-Zellen aus hämophilen Mäusen systematisch in einem sensitiven „enzyme-linked immunospot (Elispot) assay“ durchgeführt werden. Um eine detaillierte Analyse des $CD4^+$ -T-Zellepitoperepertoire zu ermöglichen, wurden 240 FVIII-Peptide, jedes 15 AS lang und 12 AS überlappend ausgewählt, um antigenspezifische T-Zellen bis auf Einzelzellniveau zu erkennen und zu quantifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Apparate und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage (μ -Gramm-Wage)	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
Brutschränke 37 °C	Heraeus, Hanau
Einmal-Skalpelle (steril)	Braun, Melsungen
Elispot-Analyser	A.EL.VIS, Hannover
FACScan (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Röhrchen (15, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Gefrierschrank -80 °C	Colora/Heraeus, Hanau
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, NY
Lichtmikroskope	Zeiss, Göttingen; Leica, Wetzlar
Macs-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Magnete (MiniMACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Microtiterplatten (96-well, steril)	Millipore, Eschborn
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
pH-Meßgerät	Knick, Berlin
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen für Pipetten	Dahlhausen, Köln
Stericup-Filter	Millipore, Eschborn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22 μ m, 0,45 μ m)	Millipore, Eschborn
Schüttler für Schalen	IKA, Staufen
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge (L8-M)	Beckman, München
Vortexer	Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen; Becton Dickinson, Heidelberg; Corning, Wiesbaden
Zellsieb (40 μ m)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge (Laborfuge 400R)	Heraeus, Hanau

2.1.2 Reagenzien, Medium, Zusätze

(In einzelnen Fällen sind neben den Herstellern bzw. Lieferfirmen die entsprechenden Produktnummern angegeben, um Verwechslungen mit ähnlichen Produkten zu vermeiden oder wenn die genaue Beschreibung der Produktzusammensetzung zu umfangreich wäre.)

Ammoniumchlorid	StemCell Technologies, Vancouver, BC
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose); Life Technologies (#21969-035), Karlsruhe
DMSO	Dimethylsulfoxid; Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Enfluran	2-Chloro-1,1,2-trifluoro-ethyl-difluoromethylether (Handelsname Ethrane); Abbott, Wiesbaden
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FBS	Fötales Rinderserum (für die Zellkultur bei 56 °C für 30 Min. hitzeinaktiviert); Seromed (#S0115), Berlin & StemCell Technologies (#06400), Vancouver, BC
Ficoll	Biocoll Separating Solution; Biochrom (#L6115), Berlin
Freund's Adjuvant (incomplete)	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	L-Glutamin; BioWhittaker, Verviers, Belgien
Haemectin SDH [®]	Biotest, Dreieich
KCL	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9%-Lsg. (steril)	Braun, Melsungen
Ovalbulin	Sigma, Taufkirchen
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺); BioWhittaker, Verviers, Belgien
Penicillin-Streptomycin	BioWhittaker, Verviers, Belgien
ReFacto [®]	FVIII (rekombinant; B-Domänen-deletiert); Wyeth, Münster
RPMI 1640	RPMI 1640 (ohne Glutamin); Biochrom (F1215), Karlsruhe
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	Becton Dickinson, Heidelberg
Trypanblau	0,4%ige Lösung; Sigma, Taufkirchen
Tween 20	BioRad, München
Wasser	Sigma (#W3500), Taufkirchen

2.1.3 Antikörper, Zytokine

Antikörper

Ratte anti-Maus CD4 (L3T4)-IgG2b	Becton Dickinson, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD 90 (Thy1.2)-IgG2b	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus-IFN- γ -Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
Biotinylierte Antikörper gegen Maus IFN- γ	Becton Dickinson, Heidelberg

Fluorescein (FITC)-konjugiert:

Ziege anti-Ratte IgG	Dianova, Hamburg
Kanninchen anti-Ratte IgG	Dianova, Hamburg

Phycoerythrin (PE)-konjugiert:

Anti humanes IFN- γ , TNF- α , IL-2,	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti humanes IL-4, IL-5	Becton Dickinson, Heidelberg

Zytokine

Murines IL-2	R&D, Wiesbaden
Rekombinantes murines IFN- γ	R&D, Wiesbaden
Murines GM-CSF	Tebu-Bio, Offenbach

2.1.4 Verwendete Testkits

Human Th1/Th2 Cytometric Bead Array	Becton Dickinson, Heidelberg
Mouse IFN- γ -Elispot Set	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.5 Angesetzte Pufferlösungen

Erythrozytenlyse-Puffer

0,8% NH₄CL in Wasser, 0,1mM EDTA, pH 7,5

Puffer für magnetische Zelltrennung

PBS, 10% FCS, 2,5% EDTA (0,25mol/l)

Elispot-Puffer

Antikörperpuffer für
anti-Maus IFN- γ :

8g NaCl, 0,2g KCL, 1,44g NaH₂PO₄·7H₂O, 0,24g
KH₂PO₄, H₂O auf 1 Liter Gesamtvolumen, pH 7,2,
Sterilfiltration, Lagerung bei 4 °C

Blockierungspuffer:

DMEM, 10% hitzeinaktiviertes FBS,
1% Penicillin-Streptomycin-L-Glutamin

Waschpuffer:

PBS, 0,05% Tween-20

Verdünnungspuffer für
biotinyliertes anti-Maus IFN- γ : PBS, 10% FBS

Facs-Puffer

PBS, 10%FCS, 0,1mM EDTA, pH 7,5

2.1.6 Mäuse

Wildtyp-Mäuse (Balb/c)

Für die Untersuchungen wurden weibliche Mäuse im Alter von 8 und 14 Wochen mit einem Mindestgewicht von 18 g eingesetzt. Die Immunisierung von Proteinen oder Peptiden erfolgte intraperitoneal (i.p.). Mäuse mit dem genetischen Hintergrund einer Balb/c-Maus besitzen H-2^d-MHC-Klasse-II-Allele. Die Mäuse wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld) gekauft.

Wildtyp-Mäuse (C57BL/6)

Für die Immunisierung wurden junge adulte Weibchen oder Männchen (8 – 14 Wochen) des Stammes C57BL/6 ebenfalls von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen. Diese Mäuse haben den genetischen Hintergrund einer C57BL/6-Maus und besitzen H-2^b-MHC-Klasse-II-Allele.

FVIII-defiziente Mäuse (E-17)

Für T-Zellen-Restimulationsexperimente wurden Milzen aus FVIII-defizienten Mäusen verwendet. Die Milzen wurden aus 8 bis 14 Wochen alten Weibchen oder Männchen des E-17-Knockout-Stammes isoliert, die von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen und in der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt gehalten wurden.

Die FVIII-Knockout-Mäuse sind durch Insertion einer *neo*-Kassette in das Exon-17 des FVIII-Gens von der embryonalen Stammzelllinie J1 mit dem genetischen Hintergrund des Stammes 129V abgeleitet (Bi et al., 1995) und wurden mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt, so dass Mäuse des Stammes C57BL/6 am besten für vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung der Disruption des FVIII-Gens geeignet sind. Die Mäuse sind charakterisiert durch die Abwesenheit einer FVIII:C-Aktivität im Plasma und durch einen überraschend milden Phänotyp (keine spontanen Blutungen).

2.2 Peptide

Die Peptide wurden bei Jerini (Jerini Biotools, Berlin) als 15-mere, mit je 12 AS Überlappung, als Pepspots® bestellt. Insgesamt wurden 240 Peptide der Regionen ac1, AS 320-405; A2, AS 460-595; ac2, AS 700-765; ac3, AS 1630-1715; A3, AS 1790-1845; C1-C2, AS 1977-2332) (Abb.2.1 und Abb.2.2) des humanen FVIII-Proteins bezogen.

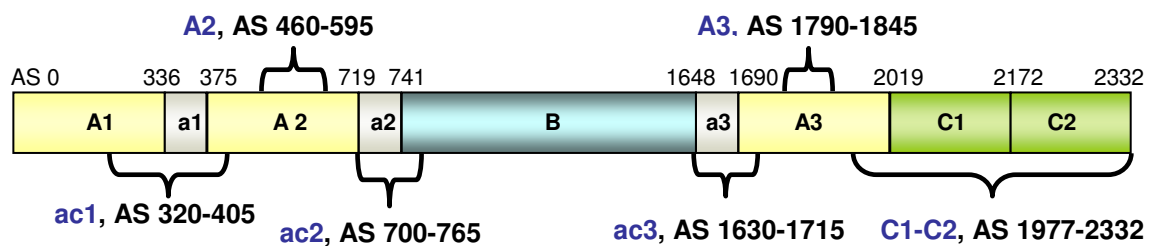


Abb. 2.1. Schematische Darstellung der Domänenstruktur und Lokalisation der ausgewählten immunogenen Regionen im FVIII-Protein.

	1	11	21	31	41	51	
1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYYLGA	VE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP	PRVPKSFPPN 60
61	TSVVYKKT	TF	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV 120
121	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFP	PG	GSHTYVWQVL	KENGPMSADP	LCLTYSYLSH 180
181	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	240
241	AASARAWPKM	HTVNGYVNR	S	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH 300
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDG	ME	AYVKVDSCPE	EPQLRMKNNE 360
361	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	420
421	PDDR	SYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGD TL 480
481	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	540
541	TKSDPRCLTR	YSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE	600
601	NRSWYLTENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL	HEVAYWYILS	660
661	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS	MENPGLWILG	CHNSDFRN RG	720
721	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL	SKNNAIEPRS	FSQNSRHPST	RQKQFNATTI	780
781	PEND	IEKTDTP	WFAHRTMPK	IQNVSDDL	MLLRQSPTPH	GLSLSDLQEA	KYETFSDDPS 840
841	PGAIDSNNSL	SEMTHFRPQL	HHSGDMVFTP	ESGLQLRLNE	KLGTAAATEL	KKLDKVSST	900
901	SNNLISTIPS	DNLAAGTDNT	SSLGPPSMPV	HYDSQLDTTL	FGKKSPLTE	SGGPLSLSEE	960
961	NNSDKLLESG	LMNSQESSWG	KNVSTESGR	LFKGKRAHGP	ALLTKDNALF	KVSISLLKTN	1020
1021	KTSNNSATNR	KTHIDGPSLL	IENSPSVWQN	ILESDFEKK	VTPLIHDRML	MDKNATALRL	1080
1081	NHMSNKTSS	KNMEMVQKK	EGPIPPDAQN	PDMSFFKMLF	LPESARWIQR	THGKNSLNSG	1140
1141	QGSPKQLVS	LGPEKSV	EGQ	NFLSEKNKVV	VGKGEFTKDV	GLKEMVFPSS	RNLFLTNLDN 1200

1201 LHENNTHNQE KKIQEEIEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGTK NFMKNLFLLS TRQNVEGSYD 1260
 1261 GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG NQTKQIVEKY ACTTRISPNT 1320
 1321 SQQNFVTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE 1380
 1381 KGAITQSPLS DCLTRSHSIP QANRSPLPIA KVSSFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY 1440
 1441 RKKDSGVQES SHFLQGAKKN NLSLAILTLE MTGDQREVG S LGTSATNSVT YKKVENTVLP 1500
 1501 KPDLPKTSGK VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLLQGTEG AIKWNEANRP 1560
 1561 GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK SQEKSPEKTA FKKKDTILSL 1620
 1621 NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR TERLCSQNP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE 1680
 1681 IDYDDTISVE MKKEDFDIY EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR 1740
 1741 AQSGSVPQFK KVVQEFQTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR 1800
 1801 PYSFYSSLIS YEEDQROGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD CKAWAYFSDV 1860
 1861 DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT IFDETKSWYF TENMERNCR 1920
 1921 PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH 1980
 1981 VFTVRKKEY KMALYNLYPG VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVYSNKC 2040
 2041 QTPLGMASGH IRDFQITASG OYGOWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII 2100
 2101 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD SSGIKHNIFN 2160
 2161 PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME SKAISDAQIT ASSYFTNMFA 2220
 2221 TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL 2280
 2281 ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM 2340
 2341 EVLGCEAQL Y

Abb. 2.2. „One-letter-code“ des humanen FVIII-Proteins (mit Signalpeptid am Beginn, violett dargestellt) und Hervorhebung der ausgewählten immunogenen Regionen (AS 320-405, schwarz; AS 460-595, grau; AS 700-765, blau; AS 1630-1715, grün, AS 1790-1845, braun; AS 1977-2332, orange).

2.2.1 Auswahl der Peptide und Herstellung von Einzelpeptidlösungen und Peptidpools

Um die Peptidspezifität FVIII-immunisierter Mäuse untersuchen zu können, wurden sechs immunogene Regionen des humanen FVIII Proteins ausgewählt und aus diesen Regionen 240 einzelne Peptide bei der Firma Jerini als Pepspots in Auftrag gegeben. Als Kontrollpeptid wurde das Modellantigen Ova₃₂₃₋₃₃₉ mitgeführt. Die Peptide (n=241) wurden von Jerini (Berlin) als membrangebundene Pepspots[®] mit einer Konzentration von 250µmol in lyophilisierten Zustand bezogen (Kramer & Schneider-Mergener, 1998; Reineke et al., 2001) (Tab. 2.1).

Rekonstitution der Peptide

Die Rekonstitution erfolgte mit 200µl sterilem PBS und vorsichtigem Schütteln (Tischschüttler, 30 Min. bei Raumtemperatur) auf eine Konzentration von 493,75µg/ml. Ausgehend von dieser „Stammlösung“ wurden für die einzelnen Peptide weitere Verdünnungen als „working solution“ hergestellt, indem 10µl jedes einzelnen Peptides der Stammlösung mit 240µl PBS (1:25) verdünnt wurden. Hierdurch ergab sich eine Konzentration von 19,75µg/ml pro Peptid. Bis zur weiteren Verwendung wurden alle Peptidlösungen bei -80°C aufbewahrt.

Zusammensetzung der Peptidpools

Aus der Stammlösung der einzelnen Peptide wurden Peptid-Pools von 9 bis maximal 15 einzelnen Peptiden gebildet. Hierbei wurden nur jene Peptide gepoolt, die einem Epitop des FVIII-Proteins (a1, A2, a2, a3, A3, C1-C2) zuzuordnen sind. Die Konzentration eines Peptids im Pool entsprach 33µg/ml (Verdünnung 1:15 der Peptidstammlösung). Bis zur weiteren Verwendung wurden alle Peptidpools bei -80°C aufbewahrt.

Um die Sensitivität einer T-Zellantwort gegen ein einzelnes Peptid in einer Mischung mit irrelevanten Peptiden bestimmen zu können, wurde das bekannte Ova-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ in verschiedenen aufsteigenden Konzentrationen mit FVIII-Peptiden gemischt. Die Konzentrationen für Ova₃₂₃₋₃₃₉ betragen hierbei 2µg/ml, 6,25µg/ml, 12,5µg/ml und 25µg/ml. Ovalbumin ist ein 45 000 Dalton schweres Glykoprotein, das die Hauptkomponente von Hühnereiweiß darstellt.

Tabelle 2.1. Nummerierung der 240 FVIII-Peptide, Zusammensetzung der 18 FVIII-Peptidpools und Darstellung der AS-Sequenzen der einzelnen FVIII-Peptide / Ova-Peptid.

Epitop ac1 Peptide Nr.	AS-Sequenz Pool 1	Peptide Nr.	AS-Sequenz Pool 4
1	MEAYVKVDSCPEEPQ	41	PGEIFKYKWTVTVED
2	YVKVDSCPEEPQLRM	42	IFKYKWTVTVEDGPT
3	VDSCPEEPQLRMKNN	43	YKWTVTVEDGPTKSD
4	CPEEPQLRMKNNEEA	44	TVTVEDGPTKSDPRC
5	EPQLRMKNNEEAEDY	45	VEDGPTKSDPRCLTR
6	LRMKNNEEAEDYDDD	46	GPTKSDPRCLTRYYS
7	KNNEEAEDYDDDLTD	47	KSDPRCLTRYYSFV
8	EEAEDYDDDLTDSEM	48	PRCLTRYYSFVNME
9	EDYDDDLTDSEMDVV	49	LTRYYSFVNMERDL
10	DDDLTDSEMDVVRFD	50	YYSSFVNMERDLASG
11	LTDSEMDVVRFDN	51	SFVNMERDLASGLIG
12	SEMDVVRFDNDDNSPS	52	NMERDLASGLIGPLL
		53	RDLASGLIGPLLCY
		54	ASGLIGPLLCYKES
		55	LIGPLLCYKESVDQ
Peptide Nr.	Pool 2	Peptide Nr.	Pool 5
13	DVVRFDNDDNSPSFIQ	56	PLLCYKESVDQRGN
14	RFDDNDDNSPSFIQIRS	57	ICYKESVDQRGNQIM
15	DDNSPSFIQIRSVAK	58	KESVDQRGNQIMSDK
16	SPSFIQIRSVAKKHP	59	VDQRGNQIMSDKRN
17	FIQIRSVAKKHPKTW	60	RGNQIMSDKRNILF
18	IRSVAKKHPKTWVHY	61	QIMSDKRNILFVSFV
19	VAKKHPKTWVHYIAA	62	SDKRNILFVSFVDEN
20	KHPKTWVHYIAAEEEE	63	RNVILFVSFVDENRSW
21	KTWVHYIAAEEEDWD	64	ILFVSFVDENRSWYLT
22	VHYIAAEEEDWDYAP	65	SVFVDENRSWYLTENI
23	IAAEEEDWDYAPLVL	66	DENRSWYLTENIQRF
24	EEEDWDYAPLVLAPD	67	ENRSWYLTENIQRFL
25	DWDYAPLVLAPDDDR		
Epitop A2 Peptide Nr.	Pool3	Epitop ac2 Peptide Nr.	Pool 6
26	TLLIIFKNQASRPYN	68	RGMTALLKVSSCDRN
27	IIFKNQASRPYNIYP	69	TALLKVSSCDRNTGD
28	KNQASRPYNIYPHGI	70	LKVSSCDRNTGDQQE
29	ASRPYNIYPHGITDV	71	SSCDRNTGDQQEDSY
30	PYNIYPHGITDVRPL	72	DRNTGDQQEDSYEDI
31	IYPHGITDVRPLYSR	73	TGDQQEDSYEDISAY
32	HGITDVRPLYSRRLP	74	QQEDSYEDISAYLLS
33	TDVRPLYSRRLPKGV	75	DSYEDISAYLLSKNN
34	RPLYSRRLPKGVKHL	76	EDISAYLLSKNNAIE
35	YSRRLPKGVKHLKDF		
36	RLPKGVKHLKDFPIL		
37	KGVKHLKDFPILPGE		
38	KHLKDFPILPGEIFK		
39	KDFPILPGEIFKYKW		
40	PILPGEIFKYKWTVT		

Peptide Nr.	AS-Sequenz Pool 7	Epitop A3 Peptide Nr.	AS-Sequenz Pool 10
77	SAYLLSKNNAIEPRS	111	ISYEEDQRQGAEPRK
78	LLSKNNAIEPRSFQ	112	EEDQRQGAEPRKNFV
79	KNNAIEPRSFQNSR	113	QRQGAEPRKNFVKPN
80	AIEPRSFQNSRHPS	114	GAEPRKNFVKPNETK
81	PRSFQNSRHPSTRQ	115	PRKNFVKPNETKTYF
82	FSQNSRHPSTRQKQF	116	NFVKPNETKTYFWKV
83	NSRHPSTRQKQFNAT	117	KPNETKTYFWKVQHH
84	HPSTRQKQFNATTIP	118	ETKTYFWKVQHHMAP
85	TRQKQFNATTIPEND	119	TYFWKVQHHMAPTKD
		120	WKVQHHMAPTKDEFD
		121	QHHMAPTKDEFDCKA
		122	MAPTKDEFDCKAWAY
		123	TKDEFDCKAWAYFSD
		124	EFDCKAWAYFSDVDL
		125	DCKAWAYFSDVDLEK
Epitop ac3 Peptide Nr.	Pool 8	Epitop C1-C2 Peptide Nr.	Pool 11
86	GRTERLCSQNPPVLK	126	NLYPGVFETVEMLPS
87	ERLCSQNPPVLKRHQ	127	PGVFETVEMLPSKAG
88	CSQNPPVLKRHQREI	128	FETVEMLPSKAGIWR
89	NPPVLKRHQREITRT	129	VEMLPSKAGIWRVEC
90	VLKRHQREITRTTLQ	130	LPSKAGIWRVECLIG
91	RHQREITRTTLQSDQ	131	KAGIWRVECLIGEHL
92	REITRTTLQSDQEEI	132	IWRVECLIGEHLHAG
93	TRTTLQSDQEEIDYD	133	VECLIGEHLHAGMST
94	TLQSDQEEIDYDDTI	134	LIGEHLHAGMSTLFL
95	SDQEEIDYDDTISVE	135	EHLHAGMSTLFLVYS
96	EEIDYDDTISVEMKK	136	HAGMSTLFLVYSNKC
97	DYDDTISVEMKKEDF	137	MSTLFLVYSNKCQTP
		138	LFLVYSNKCQTPLGM
		139	VYSNKCQTPLGMASG
		140	NKCQTPLGMASGHIR
Peptide Nr.	Pool 9	Peptide Nr.	Pool 12
98	DTISVEMKKEDFDIY	141	QTPLGMASGHIRDFQ
99	SVEMKKEDFDIYDED	142	LGMASGHIRDFQITA
100	MKKEDFDIYDEDENQ	143	ASGHIRDFQITASGQ
101	EDFDIYDEDENQSPR	144	HIRDFQITASGQYGQ
102	DIYDEDENQSPRSFQ	145	DFQITASGQYGQWAP
103	DEDENQSPRSFQKKT	146	ITASGQYGQWAPKLA
104	ENQSPRSFQKKTRHY	147	SGQYGQWAPKLARLH
105	SPRSFQKKTRHYFIA	148	YGQWAPKLARLHYSG
106	SFQKKTRHYFIAAVE	149	WAPKLARLHYSGSIN
107	KKTRHYFIAAVERLW	150	KLARLHYSGSINAWS
108	RHYFIAAVERLWDYG	151	RLHYSGSINAWSTKE
109	FIAAVERLWDYGMSS	152	YSGSINAWSTKEPFS
110	AAVERLWDYGMSSSP	153	SINAWSTKEPFSWIK
		154	AWSTKEPFSWIKVDL
		155	TKEPFSWIKVDLLAP

AS-Sequenz		AS-Sequenz	
Peptide Nr.	Pool 13	Peptide Nr.	Pool 16
156	PFSWIKVDLLAPMII	201	TWSPSKARLHLQGRS
157	WIKVDLLAPMIIHGI	202	PSKARLHLQGRSNAW
158	VDLLAPMIIHGIIKTQ	203	ARLHLQGRSNAWRPQ
159	LAPMIIHGIIKTQGAR	204	HLQGRSNAWRPQVNN
160	MIIHGIIKTQGARQKF	205	GRSNAWRPQVNNPKE
161	HGIIKTQGARQKFSSL	206	NAWRPQVNNPKEWLQ
162	KTQGARQKFSSLYIS	207	RPQVNNPKEWLQVDF
163	GARQKFSSLYISQFI	208	VNNPKEWLQVDFQKT
164	QKFSSLYISQFIIMY	209	PKEWLQVDFQKTMKV
165	SSLYISQFIIMYSLD	210	WLQVDFQKTMKVTVG
166	YISQFIIMYSLDGKK	211	VDFQKTMKVTVGTTQ
167	QFIIMYSLDGKKWQT	212	QKTMKVTVGTTQGVK
168	IMYSLDGKKWQTYRG	213	MKVTVGTTQGVKSLL
169	SLDGKKWQTYRGNST	214	TGVTTQGVKSLLTSM
170	GKKWQTYRGNSTGTL	215	TTQGVKSLLTSMYVK
Peptide Nr.	Pool 14	Epitop C1-C2	Pool 17
171	WQTYRGNSTGTLMVF	216	GVKSLLTSMYVKEFL
172	YRGNSTGTLMVFFGN	217	SLLTSMYVKEFLISS
173	NSTGTLMVFFGNVDS	218	TSMYVKEFLISSSQD
174	GTLMVFFGNVDSSGI	219	YVKEFLISSSQDGHQ
175	MVFFGNVDSSGIKHN	220	EFLISSSQDGHQWTL
176	FGNVDSSGIKHNIFN	221	ISSSQDGHQWTLFFQ
177	VDSSGIKHNIFNPPI	222	SQDGHQWTLFFQNGK
178	SGIKHNIFNPPIIAR	223	GHQWTLFFQNGKVKV
179	KHNIFNPPIIARYIR	224	WTLFFQNGKVKVFQG
180	IFNPPIIARYIRLHP	225	FFQNGKVKVFQGNQD
181	PPIIARYIRLHPHYS	226	NGKVKVFQGNQDSFT
182	IARYIRLHPHYSIR	227	VKVFQGNQDSFTPVV
183	YIRLHPHYSIRSTL	228	FQGNQDSFTPVVNSL
184	LHPHYSIRSTLRME	229	NQDSFTPVVNSLDPP
185	THYSIRSTLRMELMG	230	SFTPVVNSLDPPLLT
Peptide Nr.	Pool 15	Peptide Nr.	Pool 18
186	SIRSTLRMELMGCDL	231	PVVNSLDPPLLTRYL
187	STLRMELMGCDLNSC	232	NSLDPPLLTRYLRIH
188	RMELMGCDLNSCSMP	233	DPPLLTRYLRIHPQS
189	LMGCDLNSCSMPLGM	234	LLTRYLRIHPQSWVH
190	CDLNSCSMPLGMESK	235	RYLRIHPQSWVHQIA
191	NSCSMPLGMESKAIS	236	RIHPQSWVHQIALRM
192	SMPLGMESKAISDAQ	237	PQSWVHQIALRMEVL
193	LGMESKAISDAQITA	238	WVHQIALRMEVLGCE
194	ESKAISDAQITASSY	239	QIALRMEVLGCEAQD
195	AISDAQITASSYFTN	240	LRMEVLGCEAQDDLY
196	DAQITASSYFTNMFA		
197	ITASSYFTNMFATWS		
198	SSYFTNMFATWSPSK	Ova-Peptid	KISQAVHAAHAEINEAG
199	FTNMFATWSPSKARL		
200	MFATWSPSKARLHLQ		

2.3 Zell- und molekularbiologische Methoden

2.3.1 Intravenöse und intraperitoneale Immunisierung der Mäuse

Für die intravenösen (i.v.) Injektionen wurden weibliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 14 Wochen mit einem Mindestgewicht von 18g eingesetzt und zuvor mittels Inhalationsnarkose durch Enfluran anästhesiert. Die Injektion von 1IU Haemoctin[®] (pdFVIII) in 50µl NaCl pro 10g Körpergewicht erfolgte intravenös über die Schwanzvene. Die FVIII-Applikation erfolgte täglich an zehn aufeinander folgenden Tagen. Dieses Immunisierungsprotokoll ist angelehnt an die Substitutionstherapie von Hämophilie A-Patienten (Brackmann et al., 2000; Kreuz et al., 1999). Zur Untersuchung der FVIII-spezifischen T-Zellenantwort auf die gepoolten Peptide (Peptidpoolscreening) wurden 24 FVIII-KO-Mäuse mit FVIII immunisiert. 9 Mäuse, die mit NaCl immunisiert wurden standen zur internen Kontrolle zur Verfügung. Für die Untersuchung der FVIII-spezifischen T-Zellenantwort auf die einzelnen Peptide (Einzelpeptidtestung) wurden 8 Mäuse mit pdFVIII immunisiert und 4 Mäuse mit NaCl appliziert getestet. Am Tag 7 (Peptidpoolscreening), bzw. am Tag 17 (Einzelpeptidtestung) nach der letzten Injektion wurden die Milzen entnommen.

Zur intraperitonealen (i.p.) Injektion wurde 1µg Refacto[®] (rFVIII) gelöst in 100µl PBS, 1µg Haemoctin SDH[®] (pdFVIII) gelöst in 100µl PBS oder 100µg Ovalbumin (Ova) gelöst in 50µl incomplete Freund's Adjuvant (IFA) angesetzt. Die Maus wurde vor der Injektion mit Enfluran anästhesiert und durch einen Griff an Nackenfell und Schwanz fixiert, leicht gestreckt und kopfüber gehalten. Die Injektion wurde mit Hilfe einer Kanüle (10 x 0,5mm, Braun, Melsungen) 1cm seitlich der Medianen in Höhe des Nabels durchgeführt. Die intraperitonealen Injektionen von rFVIII wurden einmal wöchentlich an vier aufeinander folgenden Wochen durchgeführt. Sieben Tage nach der letzten Injektion wurde die Milz entnommen. Die intraperitonealen Injektionen von Ovalbumin wurden entsprechend ein Mal wöchentlich für drei Wochen vorgenommen.

2.3.2 Organentnahme und Zellpräparation

Die Mäuse wurden nach der Anästhesie mit Enfluran durch zervikale Dislokation getötet. Vor dem Öffnen der Maus wurde das Bauchfell mit 70% Alkohol desinfiziert. Um die Milz zu entnehmen, wurde das Tier auf den Rücken gelegt und mit einer sterilen Schere linksseitig ein ca. 1,5cm langer longitudinaler Hautschnitt geführt, das Peritoneum geöffnet und die Milz mit Hilfe einer stumpfen, sterilen Pinzette mobilisiert und entnommen. Nach der Entnahme

wurde die Milz zum Transport in sterilem Zellkulturmedium (DMEM/ 10%FCS) auf Eis gelegt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz mit Medium gespült und durch ein Zellsieb (Porengröße 100µm) dissoziiert. Die aus dem Milzstroma herausgelösten Zellen wurden in einem 50ml Plastikröhrchen (Falcon) mit 4ml Medium aufgefangen, das Zellsieb anschließend mehrfach mit Medium gespült. Nach Zentrifugation (1500rpm, 10', 4°C) der Zellen wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml frischem Medium resuspendiert. Die sich daran anschließende Erythrozytenlyse erfolgte mit einer kalten gepufferten Ammoniumchloridlösung im Verhältnis 9:1 durchgeführt. Das Abbrechen der Lysereaktion, unter Zugabe von kaltem PBS, erfolgte nach 10 Minuten Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden mit 20ml DMEM gewaschen (1500rpm, 10', 4°C), das Zellpellet in 20ml DMEM/10% FCS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.3.3 Isolierung von T-Lymphozyten (CD4⁺) und antigenpräsentierenden Zellen (CD90⁻) durch magnetische Zellseparation

Prinzip

Zellen können mit Hilfe der MACS Technologie (magnetic cell sorting) in hoher Reinheit aus komplexen Zellgemischen gewonnen werden. Ein Gemisch verschiedener Zellen wird mit Antikörpern gegen Membranantigene auf einer Subpopulation des Zellgemisches inkubiert. Die spezifischen monoklonalen Antikörper werden vorher an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt und auf eine Trennsäule gegeben, die in einem starken Magneten fixiert ist. In der Matrix der Säule entsteht ein magnetisches Feld, das die markierten Zellen zurückhält, nicht markierte Zellen können die Matrix ungebunden passieren. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld werden die magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluiert. Markierte Zellen (angereicherte/positive Fraktion: die erwünschten Zellen, an die die spezifischen Antikörper gebunden haben werden aus dem System aussortiert) (Abb. 2.3) und unmarkierte Zellen (depletierte/negative Fraktion: unerwünschte Zellen, die nicht mit den Microbeads gekoppelten Antikörper gebunden haben) können so fast vollständig voneinander getrennt werden. Auf diese Weise können Gemische von verschiedenen Zellpopulationen spezifisch aufgetrennt und Zellen mit gleichen spezifischen Oberflächenstrukturen angereichert werden. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wird im FACS Gerät (fluorescence activated cell sorter) analysiert.

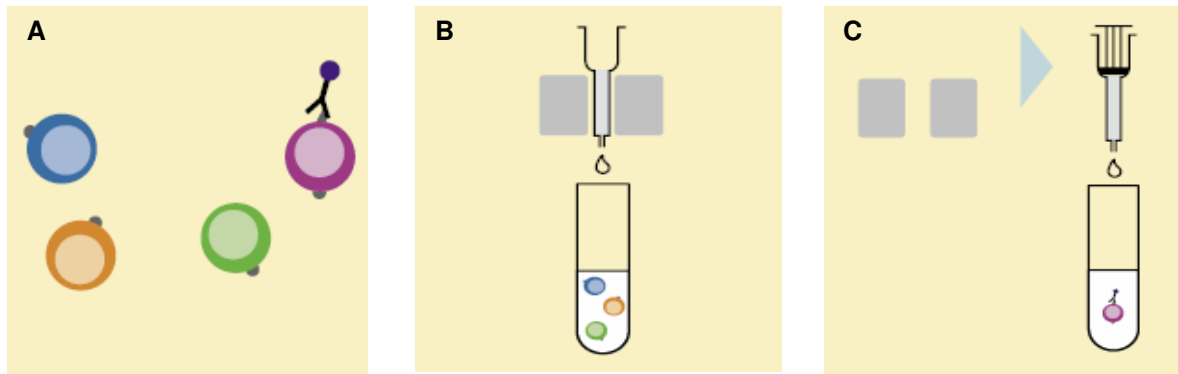


Abb. 2.3. Schematische Darstellung der Zellsortierung durch MACS Technologie. Zellen einer heterogenen Zellsuspension werden mit Antikörper-konjugierten magnetischen Partikeln (Microbeads) spezifisch markiert (A) und anschließend in der Matrix der Trennsäule im magnetischen Feld zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen die Säule ungehindert passieren (B). Die markierten Zellen können nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld eluiert werden (C).

Durchführung

Die gewaschenen und ausgezählten Milzlymphozyten wurden für 15 Minuten bei 4°C mit 90µl Puffer (PBS, 10% FCS, 2,5% EDTA (0,25mol/l)) pro 10^7 -Zellen und 10µl gekoppelten Antikörper (Microbeads) pro 10^7 Zellen inkubiert. Für die Isolierung der CD4⁺-T-Zellen aus der Milz wurden der Zellsuspension CD4 (L3T4) Microbeads zupipettiert. Zur Isolierung der T-Zellen aus der Zelllösung der Antigen präsentierenden Zellen (APC) wurden diese separat mit CD90 (Thy1.2) Microbeads versetzt. Es folgte ein Waschschriff mit Waschpuffer (300g, 10', RT). Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 500µl Puffer pro 10^8 totale Zellen aufgenommen und auf eine LS-MACS-Säule gegeben. In einigen Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Isolierung der Zielpopulation unter Verwendung der LS-Säulen effizienter ist, an Stelle der Verwendung von MS-Säulen; LS-Säulen sind kleiner und für die Separation (MiniMACS-Separator) von bis zu 10^7 Zellen besser geeignet. Die magnetischen Säulen mussten vor dem Durchfluss der Zellsuspension durch die Inkubation von 3ml Puffer adäquat vorbereitet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend über die Säule gegeben, dabei blieben die CD4⁺ oder CD90⁺-Zellen in der Magnetsäule, die CD8⁺-T-Zellen flossen als Eluat durch die Magnetsäule. Danach wurde mit 3 x 3ml Puffer nachgespült und die Säule aus dem Magnetfeld genommen. Die CD4⁺-T-Zellen konnten mit 5ml Puffer eluiert werden; sie wurden dann durch eine positive Selektion angereichert. Die Zellsuspension mit den APC war durch eine Depletion der Maus-T-Zellen (CD90⁺) getrennt worden. Nach Beendigung des Isolationsprozesses wurden die Zellen gewaschen (1800rpm, 10', RT). Die antigenpräsentierenden CD90⁻ Zellen wurden in Zellkulturmedium (DMEM/ 17,6% FCS/ 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin) in einer Konzentration von $1,17 \times 10^7$ /ml aufgenommen. Die

T-Zellen wurden nach dem Waschen in serumfreiem Medium, ohne Zusätze (DMEM), in einer Konzentration von 6×10^6 /ml eingestellt, ihre Anzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Qualität der Zelltrennung konnte mittels FACS-Analyse ermittelt werden. Aufgrund der schonenden Behandlung der Zellen sowie der geringen Größe der magnetischen Partikel war eine Beeinflussung der Zellfunktion oder Zellvitalität nicht zu erwarten.

Die Depletion der CD8⁺-T-Zellen war notwendig, weil diese neben CD4⁺-T-Zellen ebenfalls IFN- γ sekretieren können. Die Analyse der antigen-induzierten Zytokinsynthese mit dem IFN- γ -Elispot-Assay detektiert die Antwort aller T-Zellen. Die Anwesenheit von CD8⁺-Zellen würde die Interpretation der Ergebnisse erschweren. Es sollten neben der basalen Zytokinsekretion nur die Zytokine gemessen werden, die durch die Restimulation mit FVIII *in vitro* induziert wurden.

2.3.4 Messung der spezifischen Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand (Cytometric Bead Array)

Um zu untersuchen, ob FVIII-knockout-Mäuse auf eine Immunisierung mit FVIII-Protein mit einer T_H1- oder T_H2-Antwort reagieren, wurden 4 weibliche Mäuse eines Wurfes mit jeweils 1 μ g rFVIII-Protein (Refacto[®]), vier Mal im Abstand von einer Woche i. p. immunisiert. Am Tag 7 nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen der Tiere steril entnommen und in Zellkulturmedium (DMEM/10% FCS) bei 4 °C zum Transport in ein 50ml Plastikröhrchen (Falcon) gegeben. Die Zellen der steril präparierten Milzen wurden mit Hilfe eines feinmaschigen Siebes (Porengröße 100 μ m) aus dem Gewebeverband gelöst und in 20ml Zellkulturmedium gepoolt. Nach erfolgter Zellpräparation, Erythrozytenlyse (siehe 2.3.2) und Isolierung der CD4⁺-T-Zellen aus der Zellsuspension (s. 2.3.3) wurden 3×10^5 T-Zellen in 50 μ l *in vitro* mit 15 μ l rFVIII (Refacto[®]) mit je fünf unterschiedlichen Konzentrationen (0,04 μ l/ml, 0,08 μ g/ml, 0,8 μ g/ml, 8 μ g/ml, 20 μ g/ml) restimuliert. Die antigenpräsentierenden Zellen wurden aus der Milz zweier weiblicher, syngener FVIII-Knockout-Mäuse isoliert, die nicht mit FVIII-Injektionen behandelt wurden. 1×10^6 CD90⁻ depletierte APC (Makrophagen und B-Zellen) wurden in 85 μ l Zellkulturmedium (DMEM/ 17,6% FCS/ 1% Pen/Strep, 1% L-Glutamin) mit 3×10^5 T-Zellen in 50 μ l DMEM und FVIII-Protein in 15 μ l DMEM in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Inkubation erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten über 5 Tage. Ein Teil des zellfreien Überstandes (80 μ l) in jeder Vertiefung der 96-well Mikrotiterplatte wurde nach abgeschlossener Inkubation vorsichtig abpipettiert und die T_H1- und T_H2-spezifischen Zytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10) mittels Cytometric Bead Array und FACS-Analyse gemessen.

Prinzip

Um das Zytokinprofil (T_H1 - oder T_H2 -Antwort) von $CD4^+$ -T-Zellen durch die Restimulation von rFVIII zu bestimmen, werden die extrazellulären Zytokinkonzentrationen von IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 im Zellkulturüberstand untersucht. Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgt mit dem Cytometric Bead Array Kit (CBA, BD Biosciences, Heidelberg) und wird nach sehr detaillierten Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Grundlage für die Messung dieser verschiedenen Zytokine bilden sechs verschiedene Arten von Latexpartikeln, die bei Anregung mit einem Laser (488nm) unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zeigen. Jede Partikelunterart ist mit einem Primärantikörper beschichtet, der in der Lage ist ein bestimmtes Zytokin spezifisch zu binden. Standardlösungen mit bekannten Zytokinkonzentrationen und Zytokine aus den Proben können nun an die Antikörper binden. Ein weiterer PE-konjugierter Antikörper kann nun seinerseits binden und neben dem Signal des Latexpartikels nach Laseranregung ein zweites Fluoreszenzsignal aussenden (Abb. 2.4).

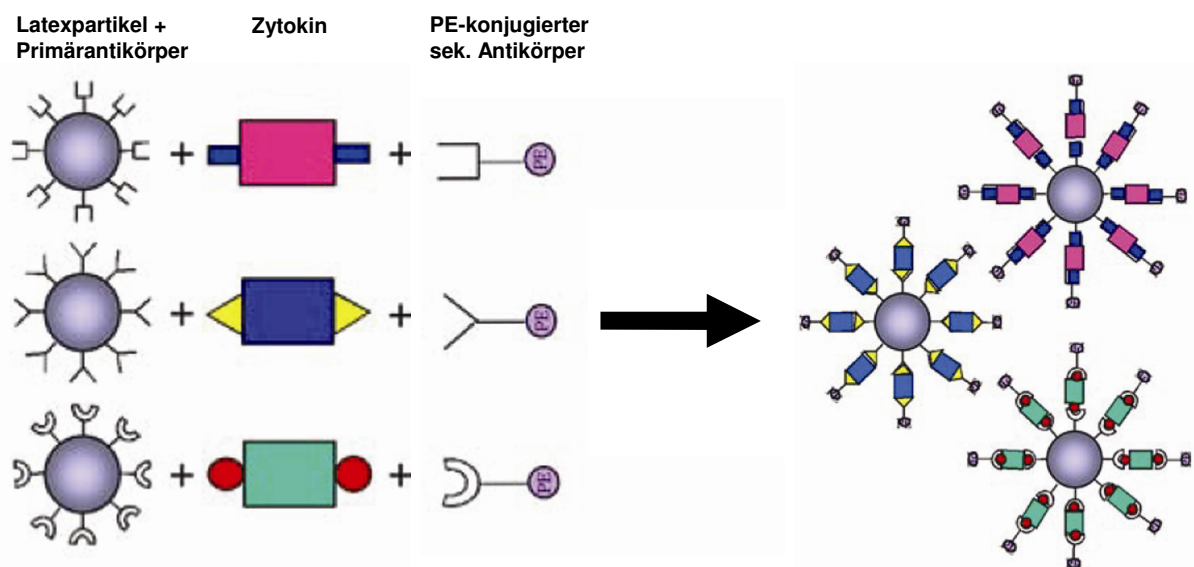


Abb. 2.4 Prinzip des Cytometric Bead Array. Die unterschiedlichen Populationen der fluoreszenzmarkierten Partikel binden an die nachzuweisenden extrazellulären Zytokine im Zellkulturüberstand. Zur Quantifizierung dieser Bindung wird ein sekundärer PE-markierter Antikörper eingesetzt. Diese Komplexe aus Latexpartikeln, Zytokin und sek. Antikörper können im FACS-Gerät gemessen werden.

Aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel lassen sich die Zytokine diskriminieren (FL3: 670nm), zum anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper auf die Konzentration der verschiedenen Zytokine geschlossen werden (Abb. 2.5).

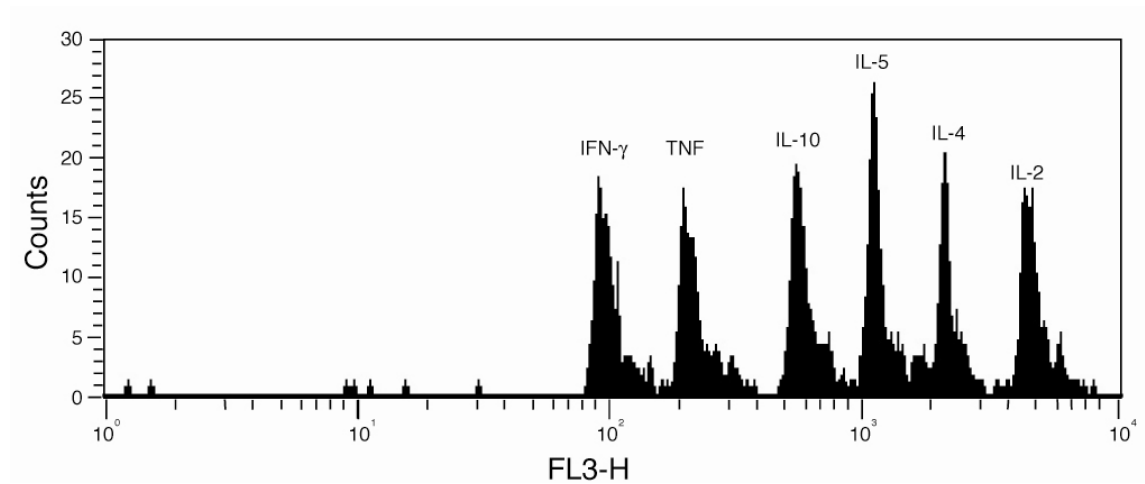


Abb. 2.5 Die sechs antikörperbeschichteten Latexpartikel sind im CBA gemischt und lassen sich aufgrund ihrer Fluoreszenzintensitäten im Kanal FL3 des FACS-Gerätes differenzieren.

Die Lösungen werden schließlich im FACScan gemessen und ausgewertet. Die im FACS-Gerät ermittelte Höhe der PE-Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Zytokins an einer bestimmten Population der antikörperbeschichteten Latexpartikel. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgt, indem eine Standardkurve mit bekannten Zytokinkonzentrationen angelegt und mit der Fluoreszenzintensität der Nachweisantikörper verglichen wird.

Durchführung

Zu 50 μ l der antikörperbeschichteten Latexpartikel wurden je 50 μ l des unverdünnten Zellkulturüberstandes bzw. der Standardlösung pipettiert. Als Zytokinstandards wurden neun Verdünnungen im Bereich von 20pg/ml bis 5000pg/ml eingesetzt (Abb. 2.6). Nach Zugabe von 50 μ l des PE-konjugierten Sekundärantikörpers wurde 3 Stunden bei RT und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde 1ml Waschpuffer hinzugefügt und bei 200 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das Beadpellet in 300 μ l Waschpuffer resuspendiert und unmittelbar vor der eigentlichen FACS-Messung kurz für 3 bis 5 Sekunden durchmischt.

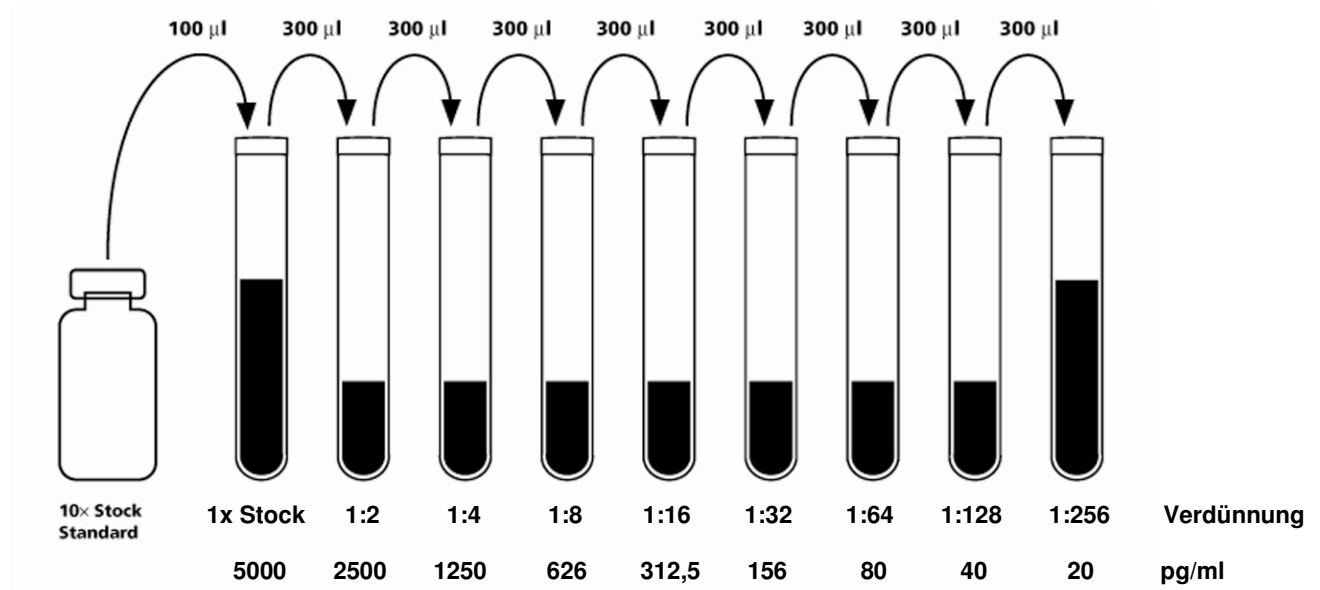


Abb. 2.6 Präparation der T_H1/T_H2 -Zytokinstandardverdünnungen mit den eingestellten Standardkonzentrationen nach der Verdünnung

2.3.5 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Medien, Zusätze und PBS wurden vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Zellzahlbestimmungen wurden mit verbesserten Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellen aus Zellsuspension im Volumenverhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4%) gemischt, so dass nicht mehr vitale Zellen blau angefärbt wurden, während die lebenden Zellen ungefärbt blieben.

2.3.6 Quantitative Nachweismethode antigenreaktiver T-Zellen (IFN- γ -Elispot)

Die Durchführung meiner Experimente erforderte eine Nachweismethode, die antigenspezifische T-Zellen auf Einzelzellniveau mit möglichst niedriger Nachweisgrenze detektiert. Der Nachweis antigeninduzierter Zytokinsynthese ist mit dem IFN- γ -Elispot-Assay („enzyme-linked immunospot assay“) möglich.

Prinzip

Die antigeninduzierte Zytokinsekretion von aktivierten T-Zellen kann genutzt werden, um antigenspezifische T-Zellen auf Einzelzellniveau zu identifizieren und zu quantifizieren.

Ich wählte hierfür einen IFN- γ -Elispot-Assay, der mit hoher Sensitivität und Spezifität eine etablierte Testmethode zum Nachweis spezifischer T-Zellen darstellt. Das von der T-Zelle sekretierte IFN- γ wird dabei durch spezifische Antikörper, die auf einer Membran am Boden einer 96-well Mikrotiterplatte gebunden sind, aufgefangen. Nach Entfernen der Zellen werden die Zytokine durch Gegenfärben mit einem zweiten IFN- γ -spezifischen Antikörper und einem Sekundärreagenz für eine enzymatische Reaktion in Form von Punkten (spots) sichtbar gemacht. Die Summe der gezählten Spots entspricht der Anzahl der reaktiven T-Zellen in 3×10^5 stimulierten CD4⁺-T-Helferzellen (Abb. 2.7).

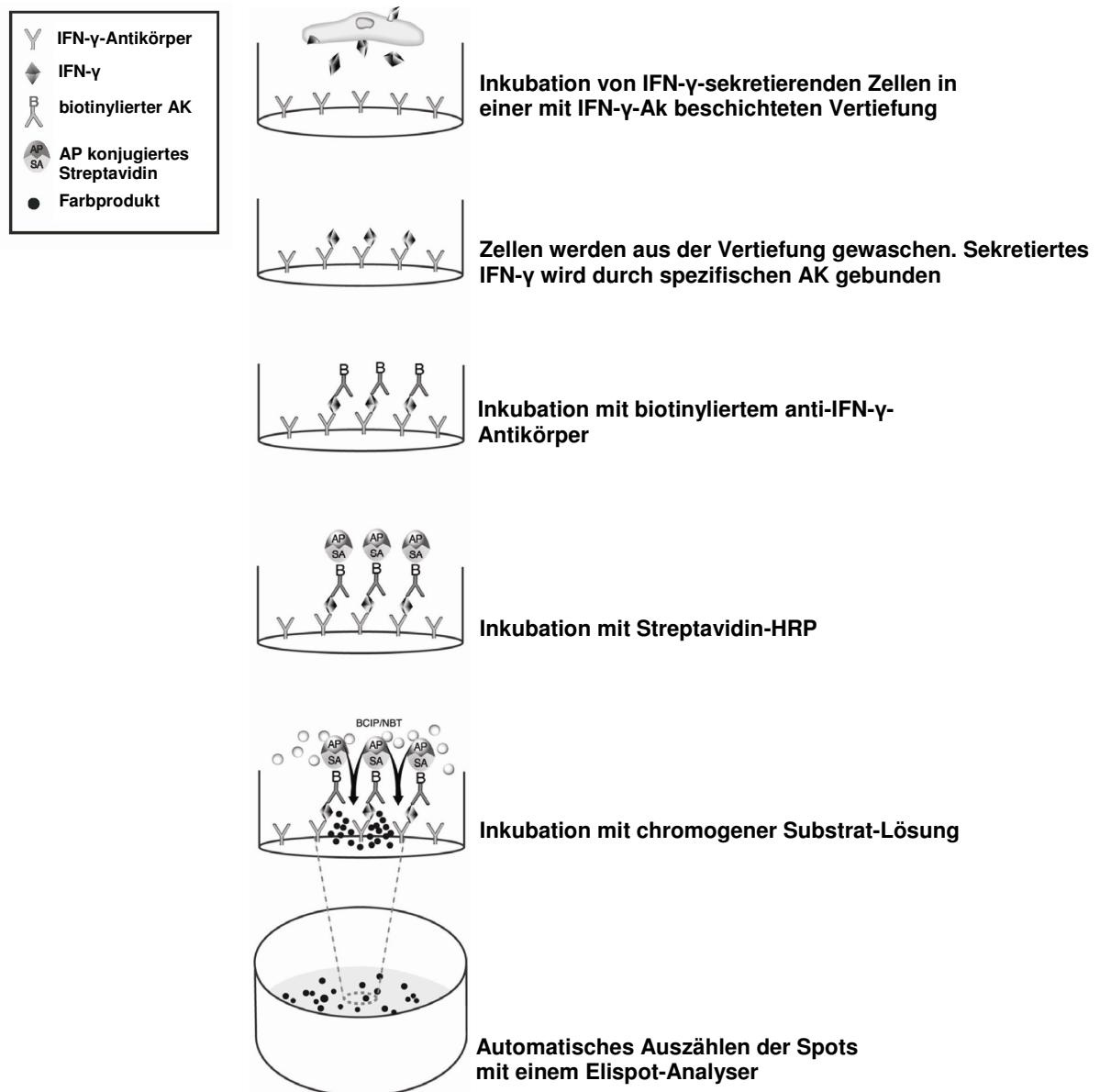


Abb. 2.7 Schematischer Überblick über das Prinzip des Elispot-Assays

Durchführung

Nitrozellulose-Platten mit 96 Vertiefungen (96-well-ImmunoSpot™-ELISPOT-Platten, BD Bioscience, Heidelberg) wurden mit monoklonalen anti-Maus-IFN- γ -Antikörpern in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS (100 μl pro Vertiefung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit blockierendem Puffer (DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin-L-Glutamin) wurde jeder Vertiefung 200 μl Blockierungspuffer zugesetzt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Dekantieren des Blockierungspuffers wurden dann je 1×10^6 antigenpräsentierende Zellen (APC) in einem Volumen von 85 μl mit 3×10^5 CD4⁺-Zellen (50 μl) inkubiert. Die APC stammten aus einer T-Zell-depletierten (CD90⁻), syngenen nicht immunisierten Maus.

Wahlweise wird zur Restimulation der T-Zellen entweder ein Protein oder ein Peptid (15 μl) in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Positivkontrolle erfolgt durch Inkubation der T-Zellen mit dem Mitogen Concanavalin A (ConA) in einer Konzentration von 0,1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die unspezifische Zellstimulation durch das Mitogen führt sowohl zu einer Zellproliferation wie auch IFN- γ -Sekretion. Zur Erstellung der Negativkontrolle diente die Inkubation der T-Zellen und APC mit Medium. Es wurde kein Mitogen oder Antigen hinzugefügt. Alle Ansätze wurden im Doppelansatz durchgeführt. Die Platten wurden dann für 72 Stunden bei 37 °C, unter gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die 96-well-Mikrotiterplatte wurde vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, anschließend wurde jede Vertiefung der Platte 3x mit 200 μl Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) jeweils für fünf Minuten inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von biotinylierten anti-Maus-IFN- γ -Antikörpern in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro Vertiefung (100 μl); für 2 Stunden wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren und dem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer wurden 100 μl der vorverdünnten Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzu gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Platten mit 200 μl Waschpuffer pro Vertiefung, wurden die Platten erneut zweimal mit PBS gewaschen und gut ausgeklopft, ihnen wurde dann eine farblose Substratlösung (100 μl pro Vertiefung) zugeführt. Die Substratlösung setzte sich zusammen aus 333,3 μl AEC-Stammlösung (100mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol gelöst in 10ml N,N-Dimethylformamid) und 10ml Azetat-Lösung, pH 5,0. Das Enzym (Peroxidase) konvertiert nun das farblose Substrat in ein farbiges Substrat. Die sich einstellende rote Farbreaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt. Die Platten werden zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss getrocknet, die Zahl der farbigen Spots mithilfe des automatisierten, computergesteuerten Lesegeräts „4 Plate ELISPOT Reader“ (A.EL.VIS, Hannover) festgestellt. Die gemessene basale IFN- γ -Freisetzung wird als Hintergrund von der Gesamtzahl der farbigen Spots subtrahiert.

2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse

Prinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden.

Dazu wird eine Zellsuspension in die partikelfreie schnell fließende Trägerflüssigkeit eines Durchflusszytometers gebracht. Hydrodynamisch fokussiert, fließen die Zellen einzeln durch einen scharf gebündelten Laserstrahl und jede Zelle erzeugt Signale, indem sie Licht streut und Fluoreszenz emittiert. Die Strahlung wird über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Der *forward scatter* (FSC) erfasst Licht, das im 180° Winkel durchgelassen wurde und misst damit die Größe der Partikel. Durch Detektion der seitlichen Streuung im *side scatter* (SSC) wird die Granularität bestimmt. Sind die Zellen mit Fluoreszenzmolekülen verbunden, werden diese Moleküle durch den Laserstrahl (Argonlaser, $\lambda=488$ nm) angeregt und geben die absorbierte Energie in Form von Licht höherer Wellenlänge wieder ab. Fluoresceinisothiocyanat und Phycoerythrin haben ein ähnliches Absorptionsspektrum, können aber durch die unterschiedlichen Maxima ihrer Emissionswellenlängen [Emmax (FITC)=520 nm, Emmax (PE)=575 nm] separat erfasst werden. Dies ermöglicht die Messung von zwei weiteren Parametern, der Grün- und Rotfluoreszenz.

Durchführung

Für die FACS-Analyse wurden CD4⁺-T-Zellen nach der magnetischen Zellseparation (MACS) (siehe 2.3.3) in einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen in PBS, 10% FCS, 2,5% EDTA (0,25mol/l) aufgenommen und für 20 Minuten bei 4°C mit 90µl FACS-Puffer und 10µl monoklonalem Antikörper der Ratte gegen Maus CD4 inkubiert. Die Färbereaktion erfolgte bei einer Temperatur von 4°C, um stoffwechselbedingte Vorgänge zu verhindern, die eine Veränderung der Oberflächenantigene zur Folge hätte. Die Färbezeit von 20 Minuten wurde streng eingehalten, da kürzere und längere Inkubationszeiten zu einer unzureichenden Färbung, bzw. einer Begünstigung unspezifischer Reaktionen führen können. Nach dem Waschen der antikörpergebundenen Zellen mit FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (1500rpm, 5Min., RT) erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1500µl FACS-Puffer. Aus dieser Zellsuspension der CD4⁺-markierten Zellen wurden 30µl (2×10^5 Zellen) entnommen und mit FACS-Puffer auf eine Konzentration von 1×10^5 CD4⁺-Zellen/100µl eingestellt. Durch den Wasch- und Färbeprozess kann mit Verlusten von Zellen gerechnet werden, folglich ist eine Einstellung von 10^5 Zellen pro FACS-Analyse erforderlich.

Die CD4 angefärbten Zellen wurden mit 5µl sekundärem Antikörper (FITC-konjugiertes Ziege anti-Ratte IgG oder FITC-konjugiertes Kaninchen anti-Ratte IgG) versetzt und 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen und der Zentrifugation (1500rpm, 5Min., RT) wurde das Zellpellet in 500µl Facs-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Zellen der Negativkontrolle (Zellsuspension vor der magnetischen Zellseparation) erfolgte die Inkubation in Facs-Puffer ohne sekundären Antikörper. Eine weitere Negativkontrolle bildete die CD4 negative Zellpopulation, die nach magnetischer Zellseparation als Eluat aufgenommen wurde (depletierte Fraktion). Sie sind nach demselben Protokoll wie die CD4 positiven T-Zellen gefärbt.

Nach dem Waschen der Zellen wurden 2×10^5 Zellen entnommen und mit 500µl Puffer zur Facs-Analyse versetzt. Die Analyse der gefärbten Proben - nach Färbeprotokoll - erfolgte innerhalb von zwei Stunden, die Proben werden bis zu Beginn der Facs-Analyse bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.4 Analyse der Bindungsaffinität von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle

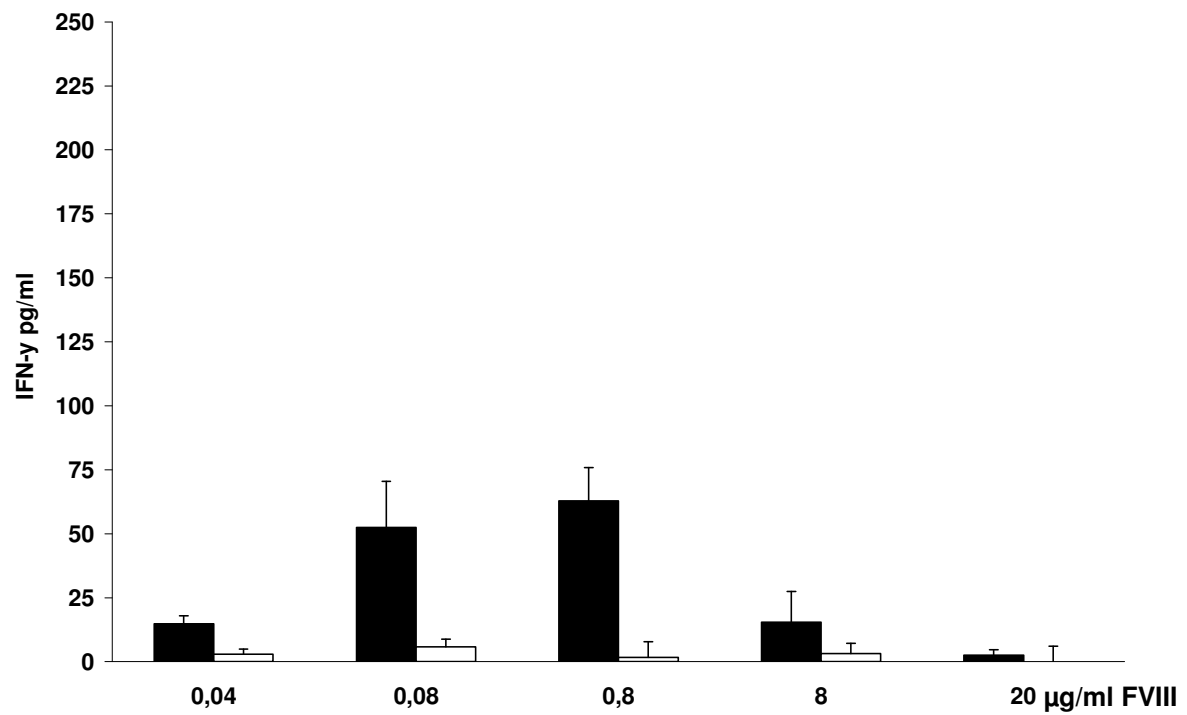
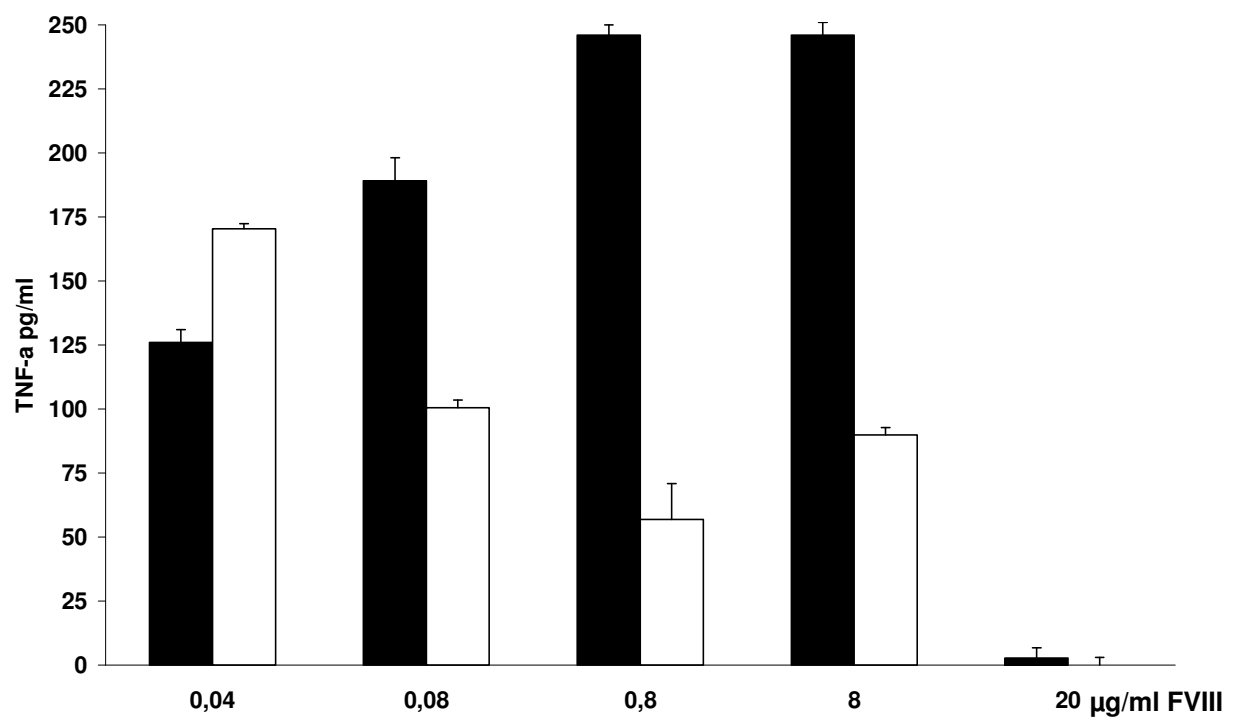
Mit Hilfe einer im Internet verfügbaren Software namens „RankPep“ (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>) konnten individuelle Bindungsaffinitäten einzelner Peptide berechnet werden. Die Berechnung der Bindungsaffinität beruht auf der Ähnlichkeit der angebotenen Peptidsequenz von bisher bekannten Peptiden, die an die definierten MHC-Klasse-II-Moleküle binden („position specific scoring matrix“). FVIII-KO-Mäuse sind in den genetischen Hintergrund einer Black 6-Maus gezüchtet, deren Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle I-A^b auf ihrer Oberfläche exprimieren. Mit diesem Wissen und unter Angabe der AS-Sequenz des Peptids konnte eine Vorhersage zur Bindung zwischen Peptid und spezifischem MHC-Klasse-II gemacht werden. Ein Wert über 10,75 beschreibt eine Bindungsaffinität des Peptids zu dem MHC-Molekül, ein Wert unter der Schwelle von 10,75 führt zu keiner Bindung des Peptides an das spezifische MHC-Molekül. Der durch das Programm definierte Wert („Score“) für eine optimale Bindung beträgt 49,14.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung der T_H1- und T_H2-spezifischen Zytokinmuster in FVIII immunisierten FVIII E-17-Knockout-Mäusen

Um festzustellen, welches Zytokin sich als Leitzytokin zur Messung der T-Zellantwort gegen FVIII im Rahmen des Epitopmappings mittels Elispot eignet, wurde zunächst untersucht, ob die T-Zellantwort FVIII-immunisierter Mäuse vorwiegend durch eine T_H1- Antwort (IFN- γ , TNF- α , IL-2) oder eine T_H2- Antwort (IL-4, IL-5) vermittelt wird. Nach einer Immunisierung hämophiler Mäuse mit drei intraperitonealen Gaben von je 1 μ g rFVIII erfolgte die Restimulation mit steigenden FVIII-Konzentrationen (0,04 μ g/ml, 0,08 μ g/ml, 0,8 μ g/ml, 8 μ g/ml, 20 μ g/ml). Es zeigte sich, dass die T-Helferzellantwort der so immunisierten FVIII-KO-Mäuse sowohl zu einer Freisetzung T_H1-assoziiierter Zytokine, als auch von T_H2-assoziierten Zytokinen führte, wobei die T_H1-Antwort prädominierte. Die Stimulation zur Freisetzung der T_H1 assoziierten Zytokine war dosisabhängig und hatte ihr Maximum bei 0,8 μ g FVIII/ml (IFN- γ = 62,6 pg/ml; TNF- α = 246 pg/ml, IL-2 = 4,8 pg/ml) (Abb. 3.1, A, B, C, siehe Seite 60 und 61). Höhere Konzentrationen von 8 μ g/ml FVIII führten dagegen zu einer deutlichen Abnahme der IFN- γ Sekretion, während die TNF- α Sekretion konstant hoch blieb. In geringerem Maße wurden auch T_H2-Zytokine freigesetzt. So betrug die Konzentration von IL-4 über alle FVIII-Konzentrationsbereiche hinweg < 6,1 pg/ml. Demgegenüber zeigte sich eine maximale IL-5 Sekretion von 62,8 pg/ml bei einer Stimulation mit 0,8 μ g/ml FVIII (Abb. 3.2, A, B).

Um die T-Zellantwort und die damit einhergehende Zytokinsekretion immunisierter Mäuse von einer Primärantwort nicht immunisierter T-Zellen abgrenzen zu können, wurden T-Zellen von nicht behandelten Mäusen *in vitro* ebenfalls mit FVIII stimuliert. Hierbei ergab sich ebenfalls eine Freisetzung T_H1- und T_H2-spezifischer Zytokine, wobei die Primärantwort gegen FVIII in unbehandelten Mäusen zu fast vergleichbar hohen TNF- α Spiegeln führte, wie bei der Sekundärantwort in immunisierten Mäusen (Abb. 3.1 A, B). Da für die weiteren Untersuchungen die Sekundärantwort gegen FVIII von vornehmlichem Interesse war, wurde die IFN- γ Freisetzung als Indikator für eine T_H1-vermittelte Antwort verwendet. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung n=3; jedes n stellt den Mittelwert aus Duplikaten dar.

A**B**

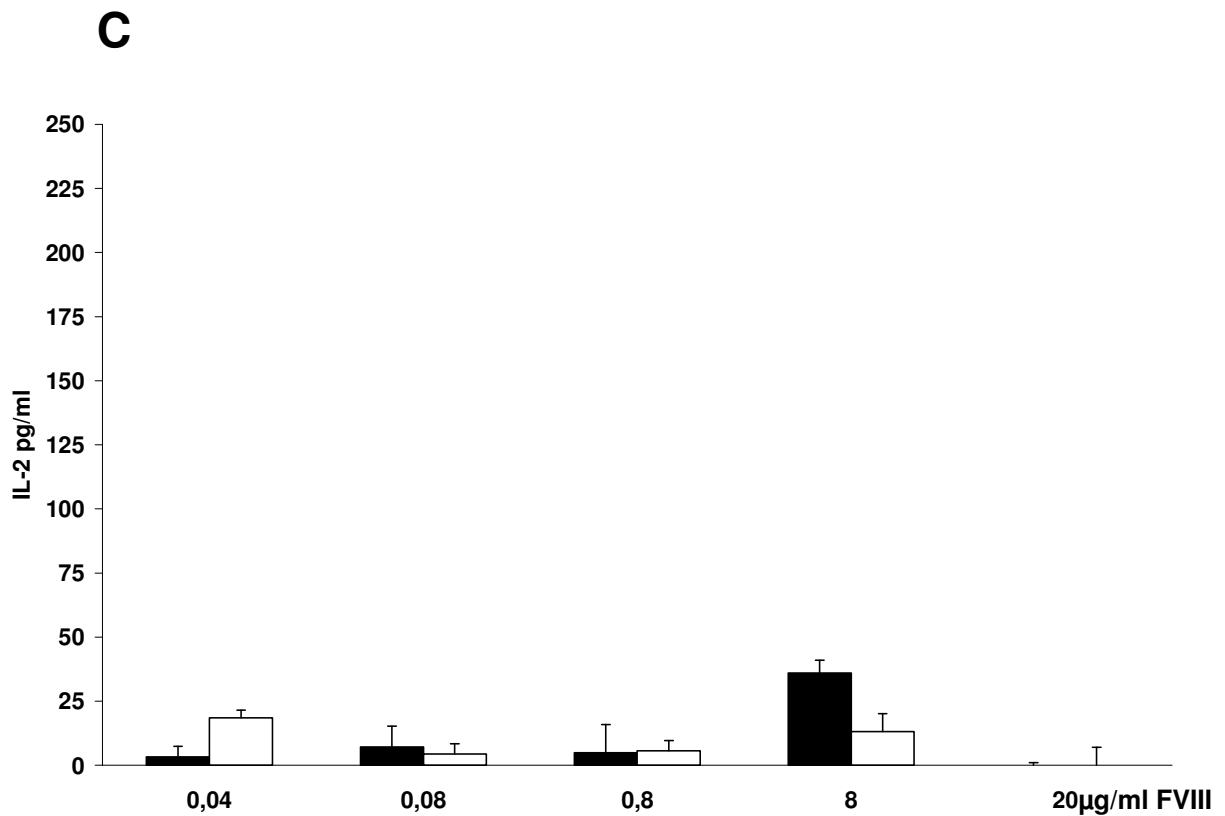


Abb. 3.1. (A, B, C) Effekt von rFVIII auf die Zytokinsekretion von FVIII-spezifischen T_H1-Zellen. Dargestellt sind die Konzentrationen (pg/ml) der sekretierten Zytokine IFN- γ (A), TNF- α (B) und IL-2 (C) durch aktivierte T-Zellen *in vitro*. 3×10^5 Milz T-Zellen immunisierter Hämophilie A Mäuse (schwarzer Balken), bzw. nicht immunisierter Hämophilie A Mäuse (weißer Balken) wurden mit fünf aufsteigenden Konzentrationen von rFVIII (0,04 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,8 µg/ml, 8 µg/ml, 20 µg/ml) restimuliert.

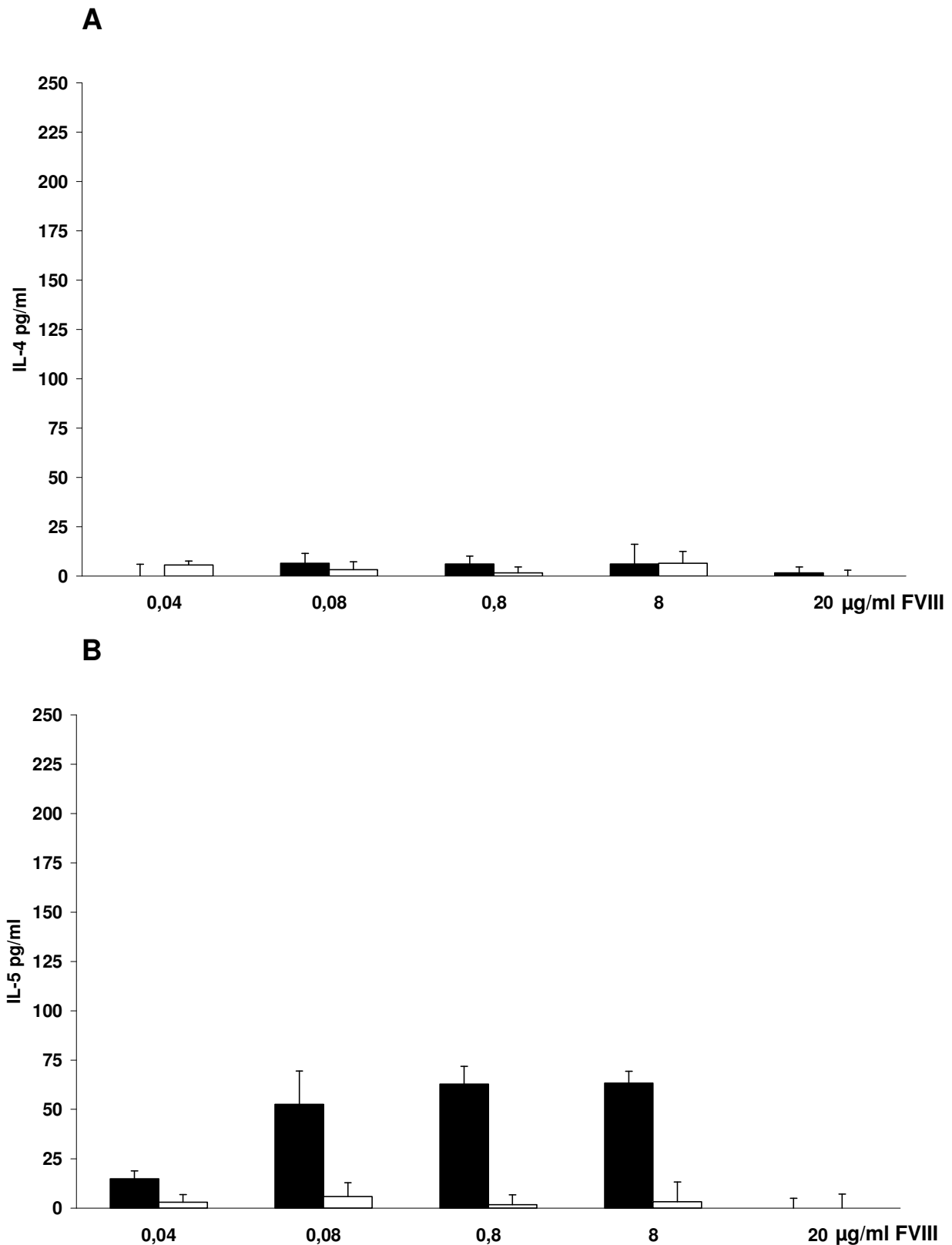


Abb. 3.2. (A-B) Verteilung des T_H2 spezifischen Zytokins IL-4 (A) IL-5 (B) bei der Restimulation mit rFVIII.

3×10^5 Milz T-Zellen wurden mit fünf aufsteigenden Konzentrationen von rFVIII (0,04µg/ml, 0,08µg/ml, 0,8µg/ml, 8µg/ml, 20µg/ml) restimuliert. Die Zytokinkonzentrationen (pg/ml) im Zellkulturüberstand sind durch schwarze Balken dargestellt. Die Werte der Zytokinkonzentrationen von T-Zellen nicht immunisierter Hämophilie A Mäuse sind in Form weißer Balken gezeigt.

3.2 Bestimmung der Frequenz Ovalbumin-spezifischer T-Helferzellen in Balb/c Mäusen mittels Elispot

Um den Nachweis und die Frequenzbestimmung antigenspezifischer T-Lymphozyten mittels Elispot zu etablieren, wurde zunächst auf ein bekanntes Modellantigen und ein ebenfalls bekanntes Mausmodell zurückgegriffen. So wurde die Kinetik einer T-Zellantwort in Balb/c Mäusen gegen das bekannte Antigen Ovalbumin (Ova) im Elispot untersucht. Nach einem Standardprotokoll immunisierte Mäuse (wöchentliche intraperitoneale Immunisierung mit 100 µg/Ovalbumin mit IFA für 4 Wochen) wurden 1 Woche nach der letzten Immunisierung sakrifiziert und ihre Milz-T-Helferzellen über Magnetsäulen isoliert. Die T-Lymphozyten wurden mit steigenden Konzentrationen des Ovalbumins inkubiert und die T-Zellantwort mittels IFN- γ -spezifischem Elispot ausgewertet. In Vorexperimenten zeigte sich, dass ein Verhältnis von 3×10^5 CD4⁺-T-Zellen pro 1×10^6 antigenpräsentierenden Zellen (APC) zu einer optimalen T-Zellstimulation führt (Daten hier nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen lies sich eine IFN- γ vermittelte T-Zellantwort in Abhängigkeit der zur Restimulation verwendeten Ovalbumin-Dosis nachweisen. Bereits eine geringe Ova-Proteinkonzentration von 0,1 µg/ml ergab eine messbare T-Zellantwort von 9,3 IFN- γ -sezernierenden CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen (Abb. 3.3). Mit steigender OVA-Konzentration nahm die Frequenz der OVA-spezifischen T-Zellen zu und erreichte ihr Maximum bei der höchsten eingesetzten OVA-Konzentration von 100 µg/ml mit 40,3 aktivierter CD4⁺-T-Zellen pro 10⁵ T-Helferzellen. Als Positivkontrolle wurde Con A 2 µg/ml verwendet, das zu einer unspezifischen Aktivierung von T-Zellen führte (194 IFN- γ -sezernierende CD4⁺-Zellen unter 10⁵-T-Zellen). Eine nicht messbare basale IFN- γ -Sekretion in den Negativkontrollen der Ansätze mit APC und T-Zellen oder Zellkulturmedium alleine machte deutlich, dass es sich hier um eine spezifische Restimulation der T-Zellen durch Ova handelte.

Es zeigte sich anhand des Ovalbumin-Mausmodells, dass die gegebenen Bedingungen, sowohl in Bezug auf die Immunisierungsstrategie, als auch für die Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer T-Zellen mittels Elispot geeignet sind, eine T-Zellantwort zu untersuchen. Es konnte weiterhin veranschaulicht werden, dass ein Verhältnis von 1×10^6 APC und 3×10^5 CD4⁺-T-Zellen notwendig ist, um eine optimale Frequenzbestimmung antigenspezifischer IFN- γ sezernierender T-Zellen zu ermöglichen. Unter diesen Bedingungen zeigte sich darüber hinaus, dass die Anzahl der spezifisch aktivierten CD4⁺-T-Zellen mit steigender OVA-Konzentration korreliert.

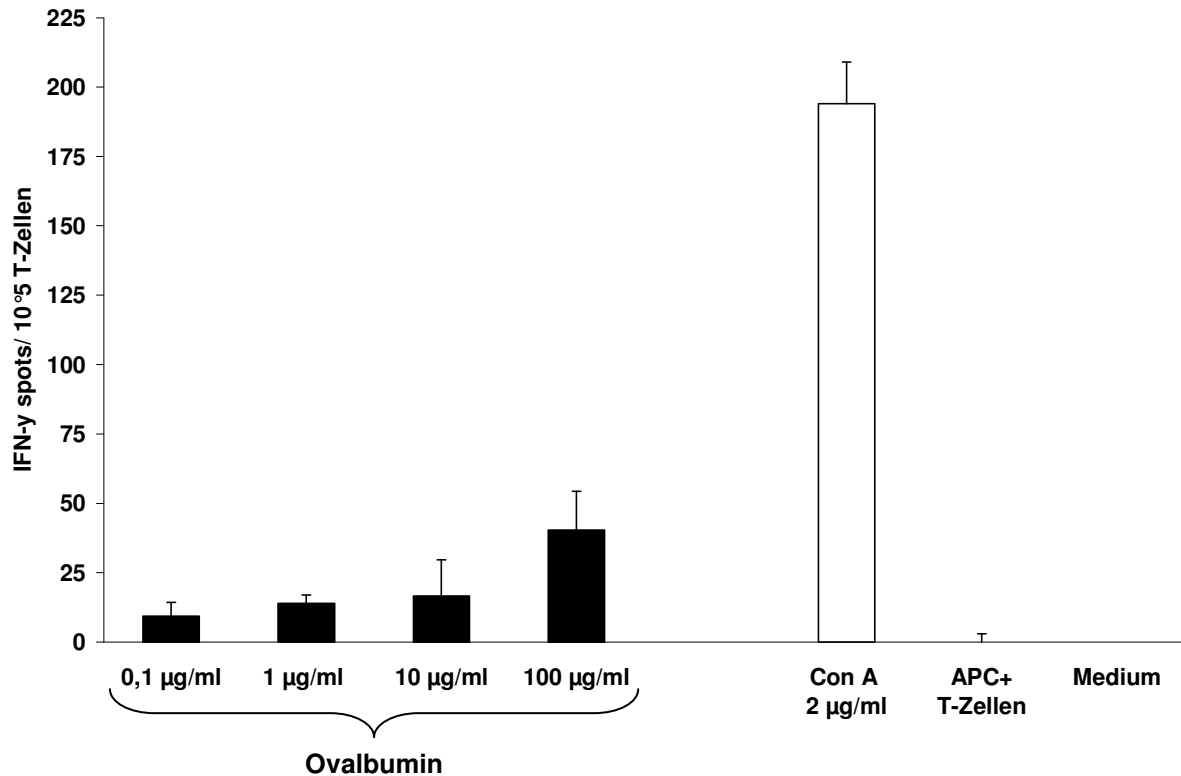


Abb. 3.3. Nachweis einer antigenspezifischen T-Helferzellantwort gegen Ovalbumin mittels Elispot.

Zunahme der *in vitro* Aktivierung IFN- γ -produzierenden CD4⁺-T-Zellen mit steigenden Ovalbuminkonzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$) nach drei Tagen Inkubation (schwarze Balken). Balb/c-Mäuse wurden mit 100 μg Ovalbumin gelöst in IFA immunisiert. Als Positivkontrolle wurden 3×10^5 T-Zellen mit Con A (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert (weißer Balken). In den Negativkontrollen wurden CD4⁺-T-Zellen ohne stimulierendes Antigen oder Mitogen mit Zellkulturmedium oder APC alleine inkubiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n=2$ angegeben; jedes n stellt den Mittelwert aus Duplikaten dar.

3.3 Untersuchungen zur Optimierung der Dauer einer Restimulation sensibilisierter T-Helferzellen für eine Frequenzbestimmung mittels Elispot

Bei der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die Aktivität Ova-spezifischer CD4⁺-T-Zellen, wurden Inkubationszeiten von 24, 72 und 96 Stunden miteinander verglichen. Da in späteren Experimenten auch mit FVIII-Peptiden gearbeitet werden sollte, wurde neben dem Ovalbumin als Gesamtprotein auch die bekannte, immunogene Domäne Ova₃₂₃₋₃₃₉ untersucht. Das Peptid wird von T-Helferzellen im Kontext des MHC-Klasse-II-Moleküls H2^d erkannt. Diese Versuche wurden daher mit Balb/c-Mäusen durchgeführt, die genetisch dem H2^d Typ zuzuordnen sind. Drei Balb/c-Mäuse wurden mit Ovalbumin immunisiert und die isolierten Milz-CD4⁺-T-Zellen zusätzlich neben steigenden Konzentrationen (0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml, 100µg/ml) von Ovalbumin, auch mit Ova-Peptid (0,8µg/ml, 1,6µg/ml) im Elispot-Assay restimuliert. Bereits nach 24 Stunden Inkubation konnte eine T-Zellantwort gegen das gesamte Ovalbuminprotein detektiert werden (0,1µg/ml Ovalbumin: 8 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵ Zellen, 1µg/ml: 10 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen, 10µg/ml: 16 CD4⁺-Zellen /10⁵-T-Zellen, 100µg/ml: 18 CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen) (Abb. 3.4 A). Eine Restimulation mit dem Ova-Peptid ergab bei einer Peptidkonzentration von 0,8µg/ml 7 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen. Die Frequenz dieser Zellen ließ sich durch eine Verdopplung der Peptidkonzentration auf 13 Ovapeptid-spezifische CD4⁺-T-Zellen steigern (Abb. 3.4 B).

Die Untersuchung ergab eine dosisabhängige Zunahme der T-Zellantwort, die bereits nach einer 24-stündigen Restimulation nachweisbar war und ihr Maximum bei einer Proteinkonzentration von 10µg/ml Gesamtprotein, bzw. der höchsten eingesetzten Peptidkonzentration von 1,6µg/ml erreichte. Eine längere Restimulation führte bei oben genannten Proteinkonzentrationen zu einer stärkeren T-Zellantwort. Diese war bei einer fünftägigen Restimulation nur unwesentlich stärker als bei einer dreitägigen Restimulation.

- 32 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵ Zellen nach 3 Tagen Inkubation,
- 37 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵ Zellen nach 5 Tagen Inkubation mit jeweils 10µg/ml Ovalbumin zur Restimulation.

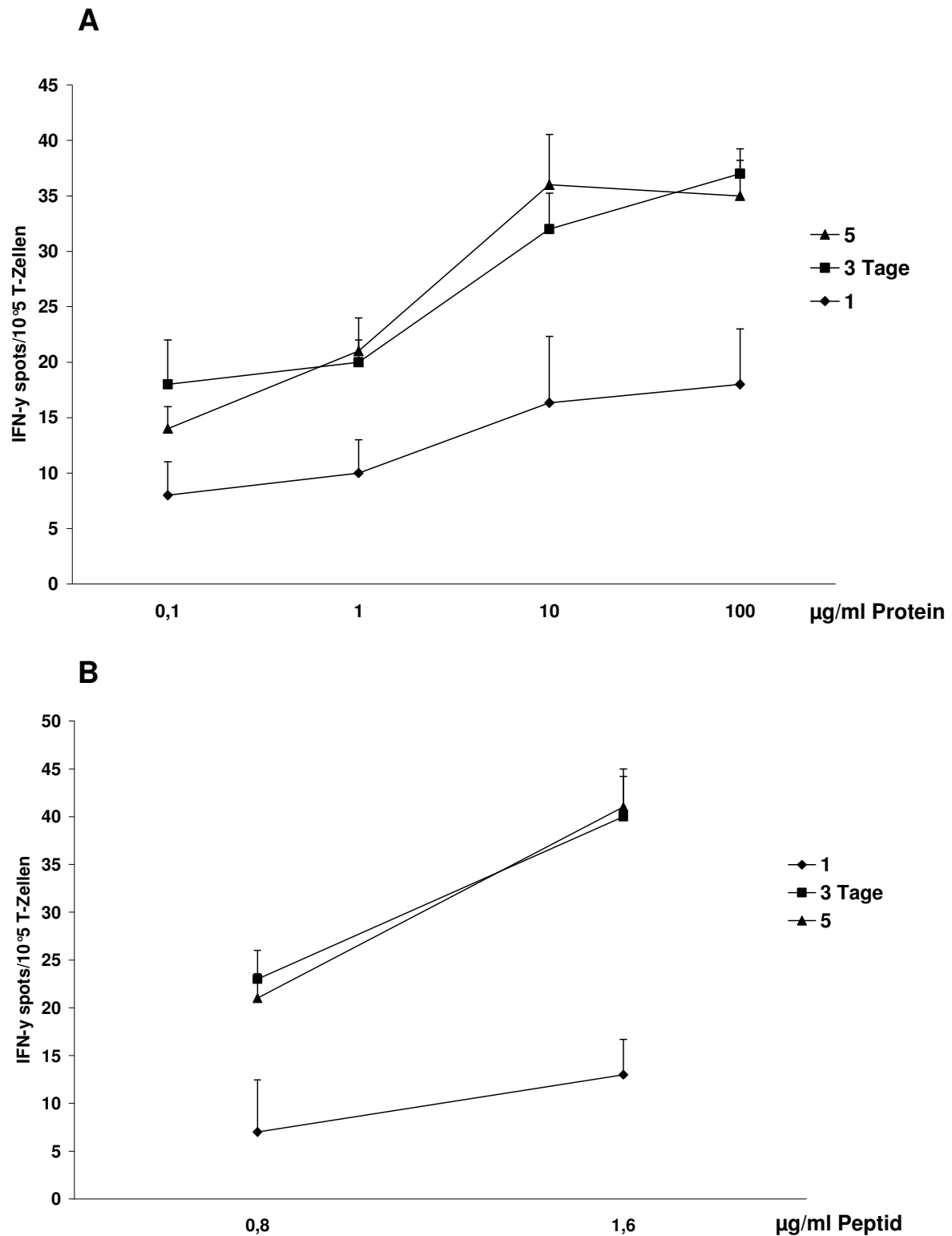


Abb. 3.4. (A, B) Kinetik Ova-spezifischer, IFN- γ -sezernierender CD4⁺-T-Zellen.

Frequenz aktivierter Milz-CD4⁺-T-Zellen, isoliert aus Balb/c-Mäusen, nach Restimulation mit Ovalbumin (A) und Ova-Peptid (B) über 1,3 und 5 Tage. Die Positivkontrolle bildeten Milz-CD4⁺-T-Zellen, stimuliert mit Con A 1 μ g/ml. Als Negativkontrollen wurden T-Zellen alleine oder mit APC zusammen inkubiert, ohne zu verzeichnende T-Zellantwort (Daten nicht im Diagramm gezeigt). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung n=3; jedes n stellt den Mittelwert aus Duplikaten dar.

3.4 CD4⁺-T-Zellantwort gegen das Modellantigen Ova-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ in einem Peptidgemisch aus 15 unterschiedlichen FVIII-Peptiden

Um die Sensitivität eines Nachweises einer T-Zellantwort gegen ein einzelnes Peptid in einem Gemisch mehrerer irrelevanter Peptide zu untersuchen, wurden sensibilisierte Milz-CD4⁺-T-Zellen Ovalbumin-immunisierter Balb/c-Mäuse mit einem Gemisch aus 15 irrelevanten FVIII-Peptiden (15-mere) restimuliert. In diesem Peptidgemisch befand sich zusätzlich das relevante Ova-Peptid₃₂₃₋₃₃₉. Diese Untersuchung sollte die Sensitivität eines Nachweises antigenspezifischer T-Zellen zeigen, da in nachfolgenden Experimenten die T-Zellen FVIII immunisierter Mäuse mit einem Pool von FVIII-Peptiden verschiedener T-Zellepitope des FVIII-Proteins untersucht werden sollte. Die optimale Peptidkonzentration, die für das Screening der Peptidpools notwendig ist, sollte daher in diesem Versuchsansatz mit dem Modellantigen Ova₃₂₃₋₃₃₉ austitriert werden.

Die 15 irrelevanten FVIII-Peptide wurden einer vergleichbaren Konzentration des Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptids zugesetzt, wobei jedes der in dem Ansatz enthaltenen Peptide auf die gleiche Konzentration eingestellt wurde. Die Restimulation der mit Ova-Gesamtprotein immunisierten Mäuse mit diesem Gemisch ergab bei der kleinsten eingesetzten Konzentration von 2µg/ml einen Nachweis der T-Zellantwort gegen das Ova-Peptid, der dosisabhängig war. Mit steigender Einzelproteinkonzentration nahm die T-Zellantwort zu und wies ihr Maximum bei der höchsten eingesetzten Peptidkonzentration (25µg/ml) auf (Abb. 3.5). Konzentrationen von 6,25µg/ml, 12,5µg/ml und 25µg/ml pro Peptid führten zu einer erhöhten Frequenz Ova-spezifischer CD4⁺-T-Zellen.

- 2µg/ml: 15 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen
- 6,25µg/ml: 17 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen,
- 12,5µg/ml: 21 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen,
- 25µg/ml: 45 IFN-γ-sezernierende CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes Ova-Peptid aus einem Peptidgemisch von insgesamt 16 unterschiedlichen Peptiden zu einer antigen-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort führt und den Nachweis im Elispot erlaubt.

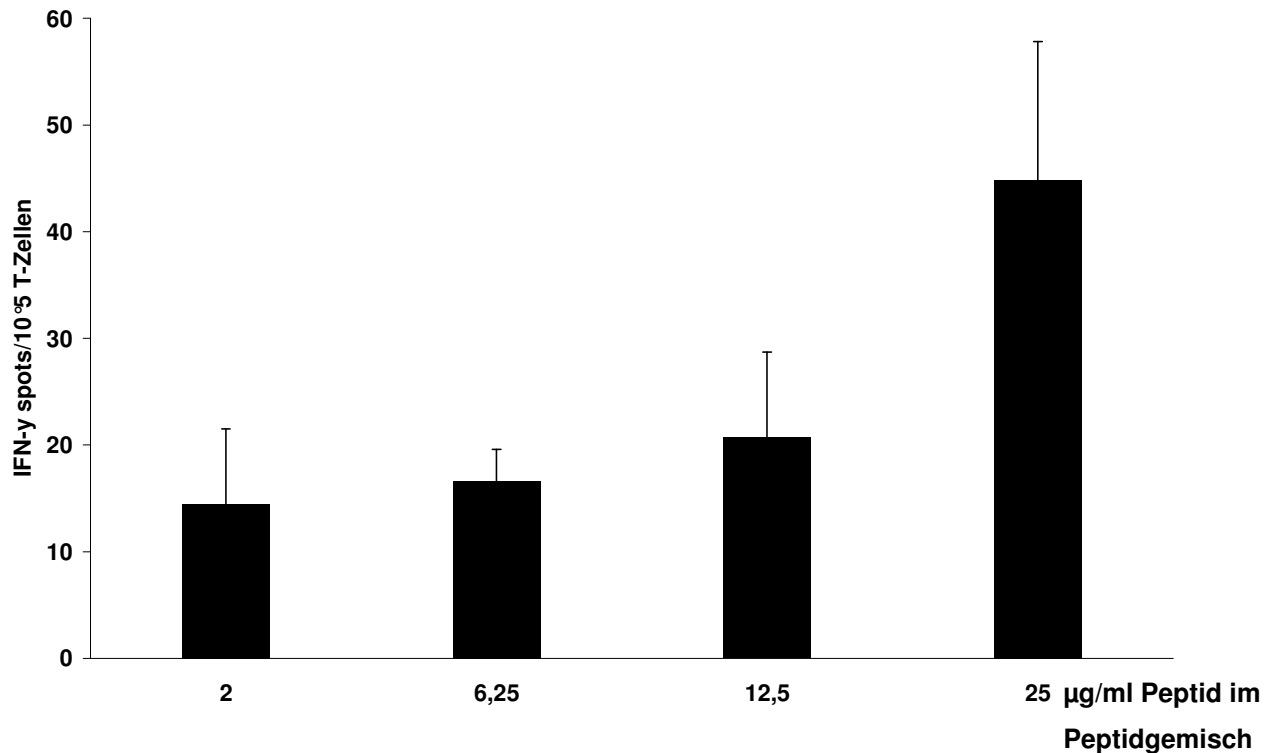


Abb. 3.5. Restimulation Ova-spezifischer CD4⁺-Zellen durch das Ova-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ in einem Peptidgemisch zusammen mit 15 irrelevanten FVIII-Peptiden. Dargestellt ist die Frequenz aktivierter, Ova-spezifischer T-Zellen nach Restimulation durch ein Peptidgemisch aus 16 unterschiedlichen Peptiden der gleichen Konzentration. Die vier untersuchten Konzentrationen (2µg/ml, 6,25µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml) beziehen sich auf jedes der 16 Peptide im Peptidgemisch (FVIII-Peptidpool Nr.15) und Ova₃₂₃₋₃₃₉. Die Positivkontrolle bilden CD4⁺-T-Zellen, stimuliert mit Con A 1µg/ml. Als Negativkontrollen wurden T-Zellen und APC alleine oder T-Zellen zusammen mit APC inkubiert, ohne Anwesenheit eines spezifischen Peptidantigens oder Mitogens (Daten nicht im Diagramm gezeigt).

3.5 Untersuchung der FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort in FVIII-Knockout-Mäusen nach Restimulation mit rFVIII-Protein und FVIII-Peptiden

Die oben genannten optimierten Kulturbedingungen zum Nachweis einer T-Zellantwort gegen ein einzelnes Peptid in einem Gemisch verschiedener irrelevanter anderer Peptide, bildeten die Grundlage für die Versuchsbedingungen zur Untersuchung der T-Zellantwort in immunisierten FVIII-Knockout-Mäusen. Dazu wurden FVIII-KO-Mäuse viermal intraperitoneal mit 1µg rekombinant hergestelltem FVIII (rFVIII) immunisiert. Die antigenspezifische CD4⁺-T-Zellantwort wurde nach Restimulation mit rekombinantem FVIII-Gesamtprotein (Refacto[®]),

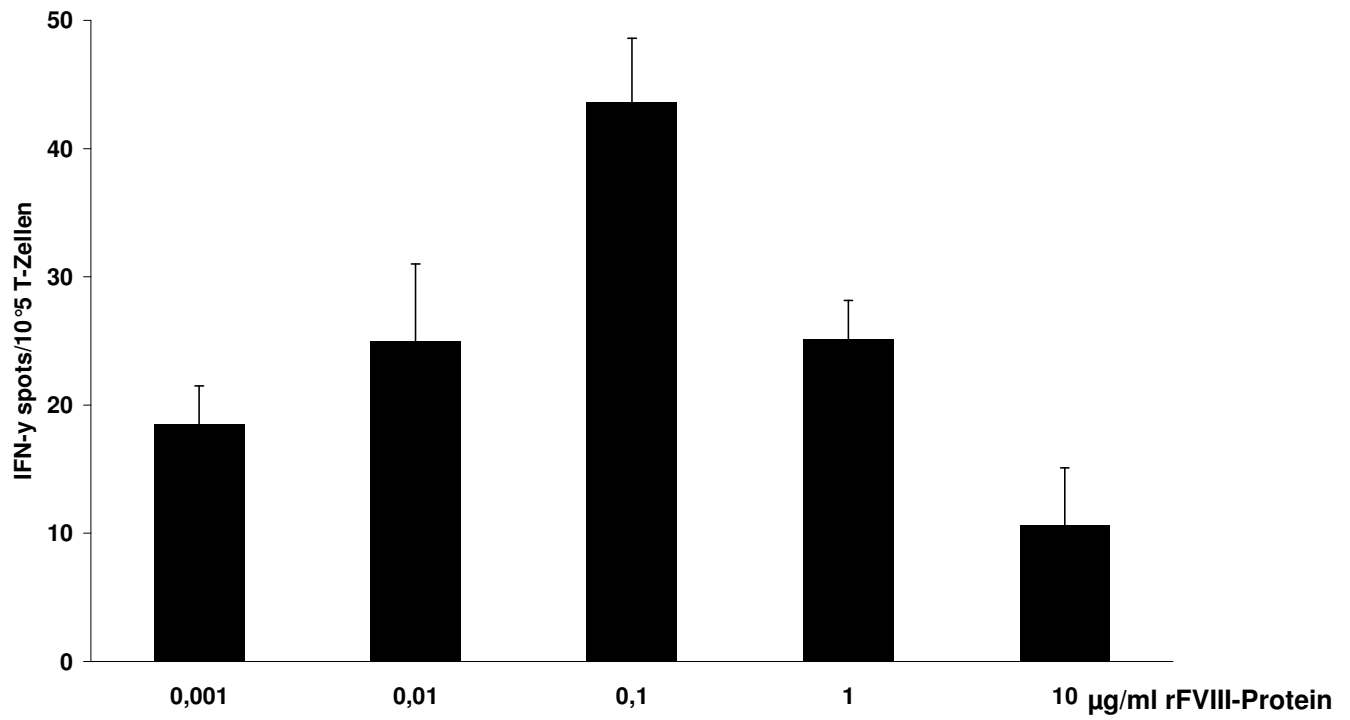
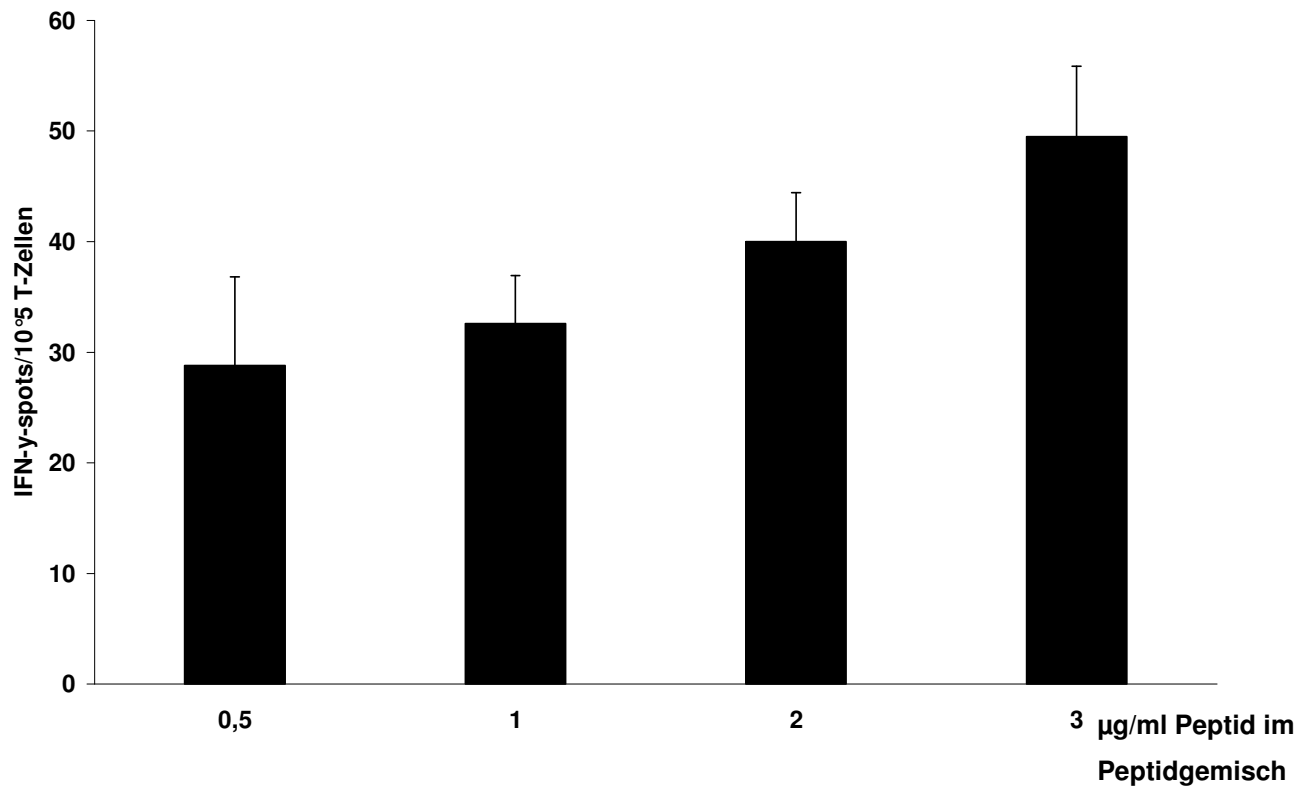
bzw. einem FVIII-Peptidpool analysiert. Als Kontrolle wurde die T-Zellantwort gegen FVIII in Mäusen untersucht, die lediglich mit NaCl „immunisiert“ wurden.

Bei der Restimulation der Milz-T-Zellen mit FVIII-Gesamtprotein zeigte sich eine von der Restimulationsdosis abhängige Frequenz IFN- γ -sezernierender, antigenspezifischer CD4⁺-T-Zellen, die bei einer Konzentration von 0,1 μ g/ml ihr Maximum hatte (44 IFN- γ -sezernierende T-Zellen/10⁵ CD4⁺-T-Zellen). Bei der Restimulation mit höheren Konzentrationen rFVIII zeigte sich dagegen eine Abnahme der spezifischen T-Zell-Antwort gegen rFVIII,

- 1 μ g/ml: 25 CD4⁺-T-Zellen/10⁵ T-Zellen,

- 10 μ g/ml: 11 CD4⁺-T-Zellen/10⁵ T-Zellen (Abb. 3.6 A).

Im Gegensatz zur Restimulation mit rFVIII-Gesamtprotein, zeigte die Restimulation mit FVIII-Peptiden kein Optimum einer T-Zellrestimulation, sondern eine kontinuierliche Zunahme der T-Zellfrequenz in der eingesetzten Peptidkonzentration. Bei der höchsten Peptidkonzentration von 3 μ g/ml zeigte sich eine Anzahl von 50 IFN- γ -sezernierenden T-Zellen/10⁵ CD4⁺-T-Helferzellen. Insgesamt war die Frequenz der spezifischen T-Zellen bei Restimulation mit rFVIII-Gesamtprotein (44 T-Zellen/10⁵ CD4-T-Helferzellen) und Restimulation mit FVIII-Peptidpool (50 T-Zellen/10⁵ CD4-T-Helferzellen) vergleichbar. Die für eine effektive Restimulation notwendige Konzentration war für den FVIII-Peptidpool größer, als für das FVIII-Gesamtprotein (0,1 μ g/ml FVIII-Protein versus 3 μ g/ml FVIII-Peptid). Die geringste Einzelpeptidkonzentration von 0,5 μ g/ml ergab im Mittel 29 FVIII-spezifische T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen, während 3 μ g/ml FVIII-Peptid 50 FVIII-spezifische T-Zellen aktivieren konnte (Abb. 3.6 B). Ein Abfall der T-Zellantwort bei steigenden FVIII-Peptidkonzentrationen, wie bei hohen FVIII-Gesamtproteinkonzentrationen beobachten, konnte bei den untersuchten FVIII-Peptidkonzentrationen nicht festgestellt werden.

Abb. 3.6 A**3.6 B**

Zu Abb. 3.6. (A, B) FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellantwort durch Restimulation mit rFVIII (A) oder FVIII-Peptiden (B).

3×10^5 Milz-CD4⁺-T-Zellen wurden mit 1×10^6 APC zum einen mit rFVIII (A) und zum anderen mit dem FVIII-Peptidgemisch Nr.4 - 15 unterschiedliche Peptide derselben Konzentrationen - (B) über drei Tage restimuliert. Positivkontrollen bildeten CD4⁺-T-Zellen stimuliert mit Con A 1 µg/ml und Con A 5 µg/ml. Negativkontrollen bildeten CD4⁺-T-Zellen aus NaCl-behandelten Mäusen, restimuliert mit FVIII-Protein oder Peptiden, ohne eine spezifische T-Zellantwort. Weitere Kontrollen stellten CD4⁺-T-Zellen alleine oder mit APC zusammen, ohne zu verzeichnende Aktivierung dar (Daten nicht im Diagramm gezeigt). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichung für n=3; jedes n ist der Mittelwert aus Duplikaten.

Abbildung 3.7 (A, B, C, D) zeigen repräsentative Elispots der FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort nach Restimulation mit rFVIII oder FVIII-Peptiden im Rahmen des oben genannten Experiments. Eine FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellantwort wurde durch Restimulation mit 1 µg/ml rFVIII (Refacto[®]) (A) sowie einem Gemisch aus 15 FVIII-Peptiden (Peptidpools Nr. 4) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 µg/ml 1 µg/ml, 2 µg/ml pro Einzelpeptid) (B) indiziert. Bei Milz-CD4⁺-T-Zellen aus NaCl-behandelten FVIII-KO-Mäusen, die mit denselben Peptidkonzentrationen restimuliert wurden, ist im Vergleich dazu eine geringe Aktivierung zu detektieren (C). Das Mitogen Con A zeigt in zwei unterschiedlich hohen Konzentrationen (1 µg/ml, 5 µg/ml) eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen, während in der Negativkontrolle (Zellkulturmedium) keine farbigen Spots zu sehen waren (D).

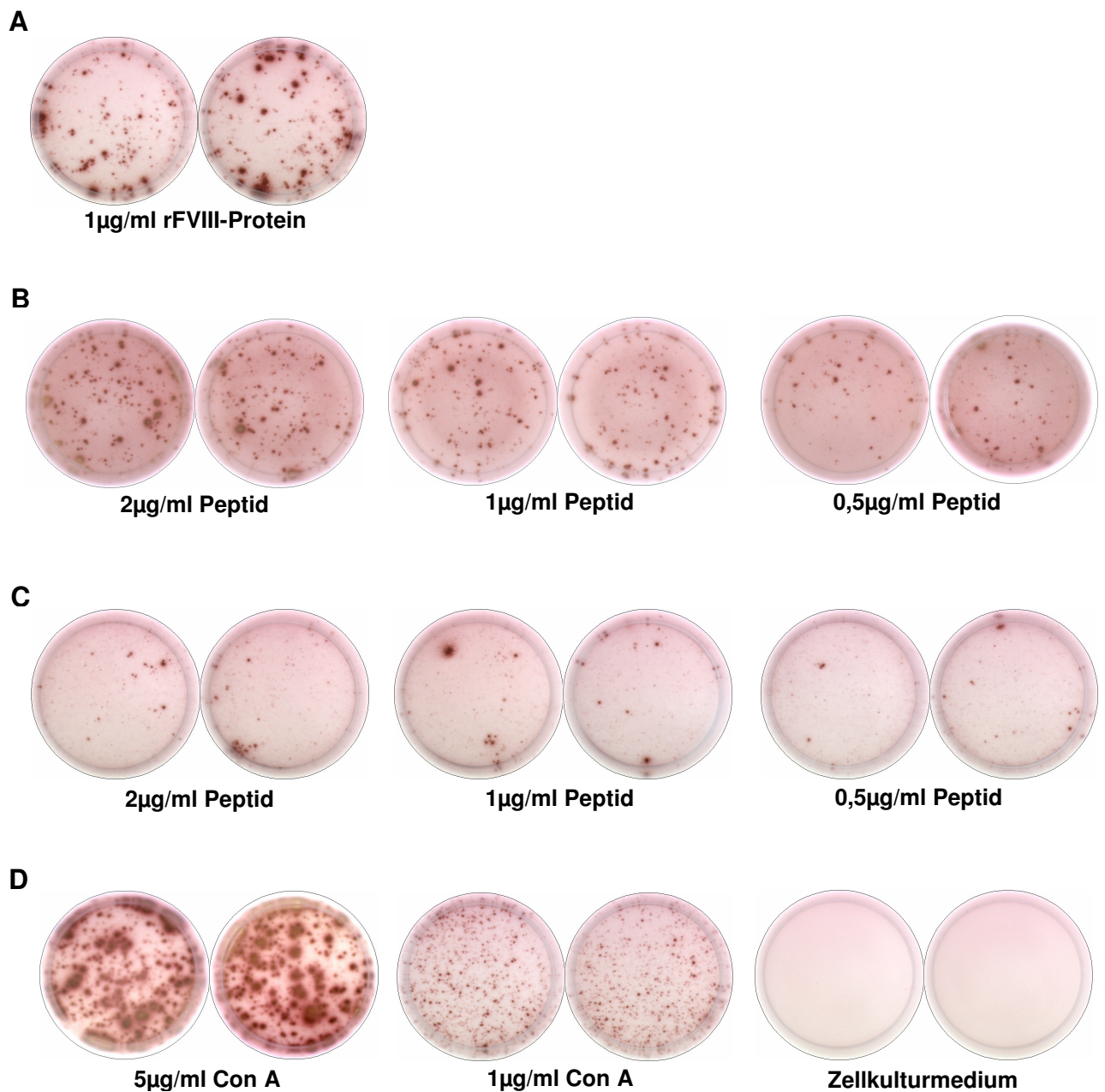


Abb. 3.7. FVIII-spezifische Milz-CD4⁺-T-Zellaktivierung im Elispot.

Als spezifisches, die CD4⁺-T-Zellen-aktivierendes Antigen, wurde rFVIII-Protein (1 µg/ml) (A) oder ein FVIII-Peptidgemisch (Peptidpool Nr. 4) in einer Konzentration von 2 µg/ml, 1 µg/ml oder 0,5 µg/ml pro Peptid (B) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden isolierte CD4⁺-T-Zellen aus NaCl-behandelten Mäusen mit den gleichen Antigenen restimuliert (C) sowie Zellkulturmedium ohne Zusatz von Zellen oder Antigenen inkubiert (D). Als Positivkontrolle wurden CD4⁺-T-Zellen mit Con A (5 µg/ml, 1 µg/ml) aktiviert (D).

In einem weiteren Schritt sollte die Spezifität der T-Zellantwort gegen FVIII in FVIII-immunisierten FVIII-KO-Mäusen unter den etablierten Versuchsbedingungen weiter untersucht werden. Hierzu wurden FVIII-KO-Mäuse dreimal im Abstand von einer Woche mit 1 µg pdFVIII (Haemoctin SDH[®]) intraperitoneal immunisiert. Anschließend wurden isolierte Milz-CD4⁺-T-Zellen mit einem FVIII-Peptidgemisch (Peptidpool Nr. 5, zusammengesetzt aus 12 unterschiedlichen FVIII-Peptiden) und pdFVIII (Haemoctin SDH[®]) restimuliert. Als Kontrolle wurde zusätzlich mit Ovalbumin und dem für FVIII-KO-Mäuse nicht-immunogenen Ova-Peptid (Ova₃₂₃₋₃₃₉) restimuliert. Die beiden letztgenannten Proteine/Peptide sollten zu keinem Nachweis einer spezifischen T-Zellantwort führen. Die Frequenz antigen-spezifischer CD4⁺-T-Zellen in 10⁵-CD4⁺-T-Zellen wurde als Stimulationsindex (SI) angegeben.

Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen bei Restimulation mit dem FVIII-Peptidgemisch und Haemoctin[®]. Bei einer Einzelpeptidkonzentration der im Peptidgemisch enthaltenen Peptide von 0,8 µg/ml und 1,6 µg/ml konnte ein SI von 10, bzw. 13 gemessen werden (Abb. 3.8). Die Restimulation mit pdFVIII (Haemoctin[®]) führte bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu einem SI von 10 und bei 5 µg/ml FVIII-Protein zu einem SI von 7.

Ovalbumin und das Ova-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ führten zu keiner spezifischen (SI < 3) Restimulation. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml Ovalbumin konnte ein SI von 1,3 detektiert werden, bei 0,8 µg/ml Ova-Peptid und 1,6 µg/ml Ova-Peptid konnte ein SI von 1,3, bzw. 1,9 gemessen werden.

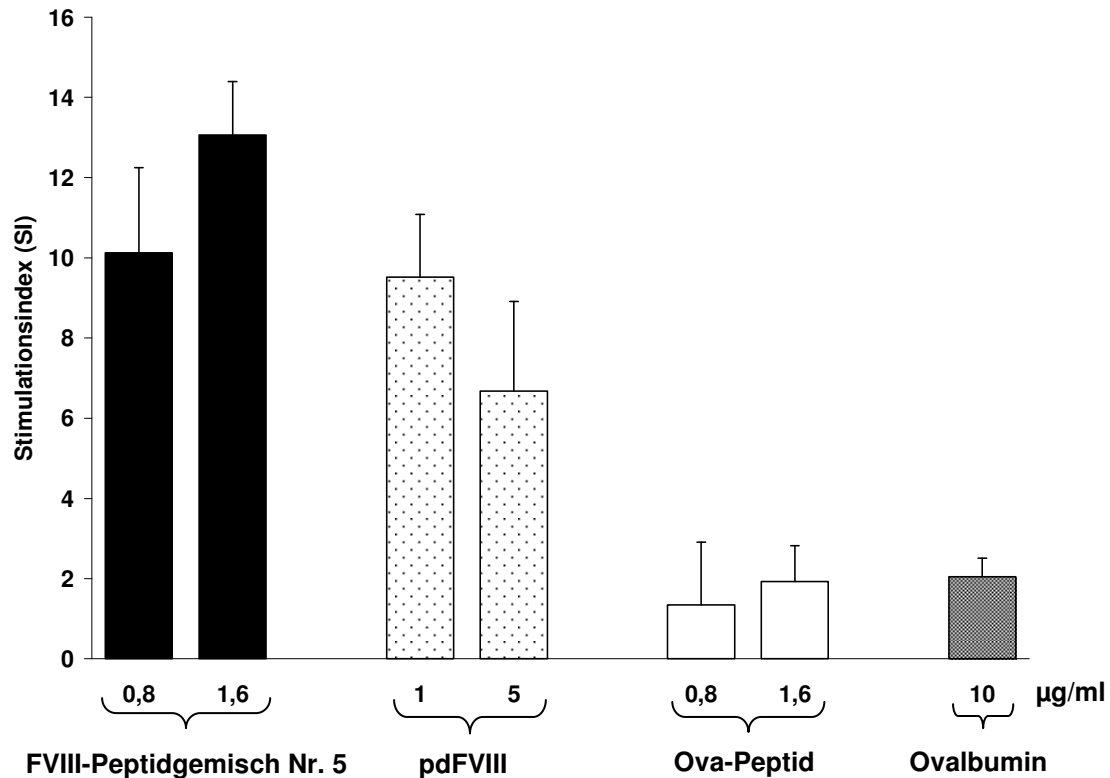


Abb. 3.8. Restimulation FVIII-sensibilisierter CD4⁺-Zellen mit FVIII-Peptidgemisch, pdFVIII, Ova-Peptid und Ovalbumin.

FVIII-Peptidgemisch Nr.5 beinhaltet 12 unterschiedliche FVIII-Peptide derselben Konzentration. Stimationsindex (SI) = Zahl der stimulierten T-Zellen in Anwesenheit vom spezifischen Antigen durch die Zahl aktivierter T-Zellen ohne Restimulation (Hintergrund). Ab einem Stimationsindex von 3, d.h. einer 3-fach höheren Frequenz aktivierter T-Zellen im Vergleich zum Hintergrund, geht man von einer spezifischen T-Zellaktivierung aus, während ein SI von < 3, bzw. 1 keine signifikante Aktivierung im Vergleich zum Hintergrund zeigt. Als Positivkontrolle für eine unspezifische T-Zellaktivierung durch das Mitogen Con A wurden im Mittel 54 IFN- γ -sezernierende CD4⁺-T-Zellen (SI 22) gemessen (Daten im Diagramm nicht gezeigt).

3.6 FVIII-Peptidpoolscreening

Nach Untersuchung der CD4⁺-T-Zellantwort in FVIII-KO-Mäusen nach Restimulation mit rFVIII, pdFVIII und FVIII-Peptiden, die spezifisch gegen FVIII gerichtet war, sollte nun untersucht werden, ob die CD4⁺-T-Zellantwort gegen bestimmte zu identifizierende Epitope des FVIII-Proteins gerichtet ist. Hierzu wurden 24 FVIII-KO-Mäuse mit jeweils 1IU Haemoclin® in 50µl NaCl pro 10g Körpergewicht intravenös über die Schwanzvene immunisiert. Die FVIII-Immunsierung erfolgte täglich an zehn aufeinander folgenden Tagen. Als Kontrolle wurden 9 FVIII-KO-Mäuse nach dem gleichen Schema mit NaCl „immunisiert“. Am Tag 7 nach der letzten Immunisierung wurden die Milz-CD4⁺-T-Zellen entnommen. Anschließend wurden die T-Zellen der immunisierten Mäuse mit 18 verschiedenen FVIII-Peptidpools bekannter immunogener FVIII-Epitope restimuliert. Die FVIII-Peptidgemische setzten sich aus 9 bis maximal 15 einzelnen FVIII-Peptiden des gleichen Epitops zusammen, wobei die Konzentration pro Einzelpeptid 1µg/ml betrug. Peptidgemische, die zu einer T-Zellreaktion führten, sollten im weiteren Verlauf auf ihre Einzelpeptide hin untersucht werden, um immunogene T-Zellepitope zu identifizieren.

Wie in Abb. 3.9 A gezeigt, führten alle untersuchten Peptidpools zu einem Nachweis aktivierter T-Lymphozyten gegen das jeweils eingesetzte Peptidgemisch. Die Frequenz der aktivierten T-Zellen lag bei einer Restimulation mit FVIII-Peptidpools im Mittel bei 24 IFN-γ-sezernierenden CD4⁺-T-Zellen /10⁵ T-Zellen, während sich in Ansätzen ohne Zugabe von FVIII-Peptiden (Negativkontrollen) lediglich 9 aktivierte T-Zellen/10⁵ T-Zellen nachweisen ließen.

Entgegen der Erwartung ergab die Analyse der CD4⁺-T-Zellantwort eine vergleichbare Frequenz aktivierter CD4⁺-T-Zellen bei allen 18 untersuchten FVIII-Peptidpools; es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierung der T-Zellen durch die einzelnen FVIII-Peptidgemische festgestellt werden. Als Positivkontrolle wurden isolierte Milz-CD4⁺-T-Helferzellen neben den FVIII-Peptiden auch mit rFVIII restimuliert. Bei 0,1µg/ml rFVIII waren im Mittel 75 FVIII-spezifische T-Zellen in 10⁵ T-Zellen zu detektieren. Höhere rFVIII-Konzentrationen führten zu der bereits in Vorexperimenten beobachteten Abnahme (siehe Abb. 3.6 A, Seite 70) der T-Zellaktivierung (1µg/ml = 71 stimulierte CD4⁺-T-Zellen; 10µg/ml = 40 stimulierte CD4⁺-T-Zellen).

Con A (1µg/ml) stimulierte 84 CD4⁺-Zellen aus 10⁵ T-Zellen. Im Gegensatz zur Restimulation mit 1µg/ml FVIII-Peptidpool (24 IFN-γ-sezernierenden CD4⁺-T-Zellen /10⁵ T-Zellen) zeigte die Restimulation mit einer höheren Peptidkonzentration (1,6µg/ml) eine leichte Zunahme der T-Zellfrequenz (27 IFN-γ-sezernierenden T-Zellen in 10⁵ CD4-T-Helferzellen). Bei einer eingesetzten Peptidkonzentration von 0,8µg/ml zeigte sich eine Anzahl von 20 IFN-γ-sezernierenden T-Zellen in 10⁵ CD4-T-Helferzellen.

Als Negativkontrolle wurden CD4⁺-T-Zellen mit APC ohne Zusatz von FVIII inkubiert. Hier zeigte sich nur eine geringe basale Aktivierungsfrequenz von im Mittel 9 CD4⁺-Zellen in 10⁵ T-Zellen (Abb. 3.9 B). Die Frequenz der spezifischen CD4⁺-T-Zellen lag nach Restimulation mit 1 µg/ml FVIII-Gesamtprotein bei 71 T-Zellen/10⁵ CD4-T-Helferzellen und nach Restimulation mit 1 µg/ml Einzelpeptid im Peptidpool bei 24 T-Zellen/10⁵ CD4-T-Helferzellen.

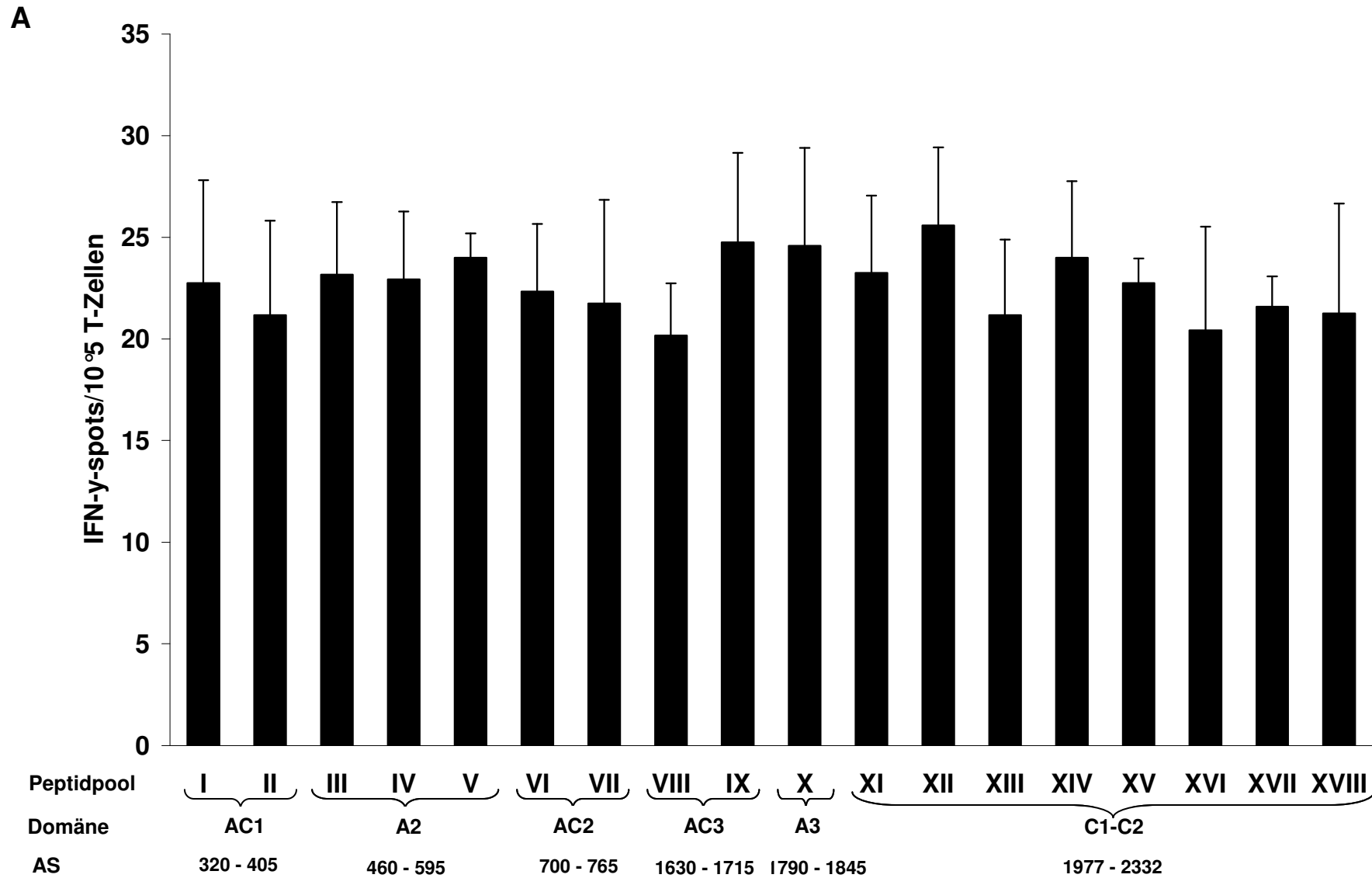


Abb. 3.9 A CD4⁺-T-Zellaktivierung durch 18 unterschiedliche FVIII-Peptidpools nach *in vivo* Sensibilisierung mit pdFVIII. Jeder Balken repräsentiert eines der 18 FVIII-Peptidgemische mit Bezeichnung der FVIII-Domäne und des dazugehörigen Aminosäureabschnittes.

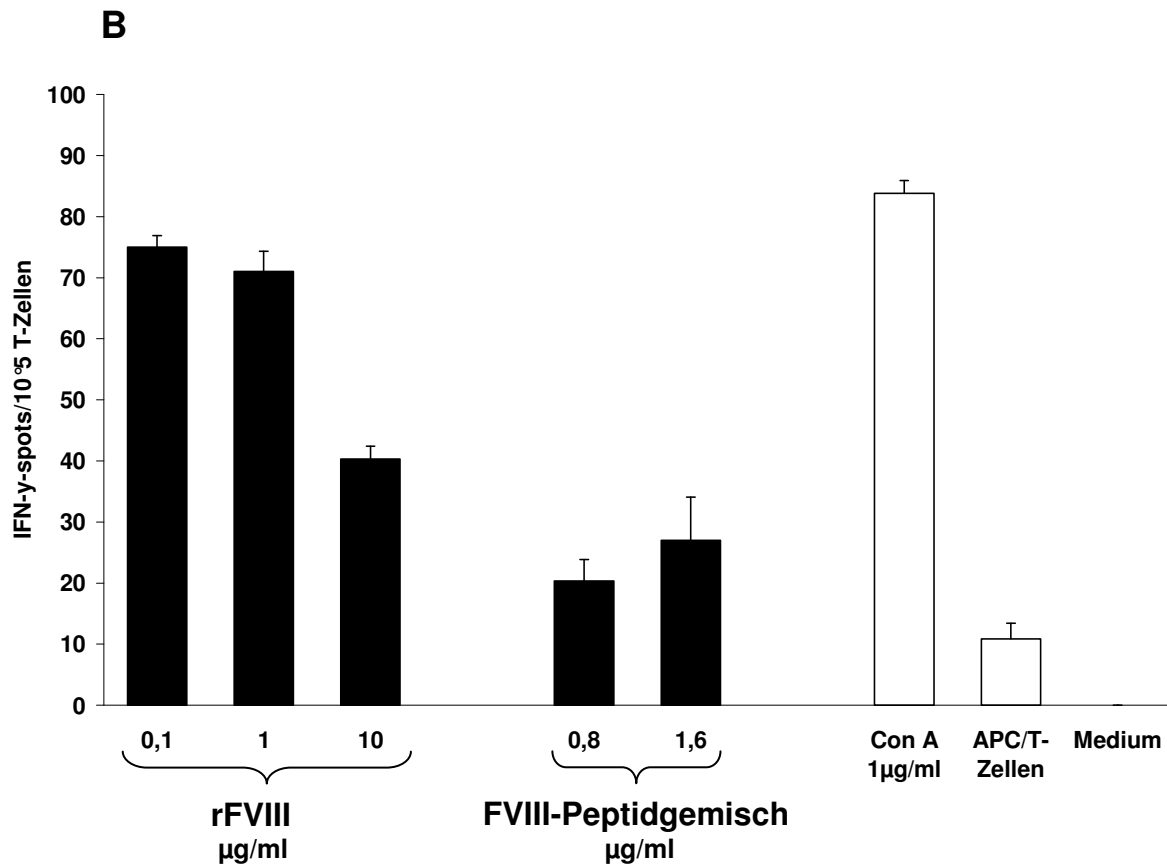


Abb. 3.9 B CD4⁺-T-Zellaktivierung durch rFVIII und Con A.

Dargestellt - in Form von schwarzen Balken - ist die Anzahl der restimulierten CD4⁺-T-Zellen aus 10⁵ CD4⁺-T-Zellen durch rFVIII (0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml) und durch das FVIII-Peptidgemisch Nr. 14 (0,8µg/ml, 1,6µg/ml).

Die Restimulation der CD4⁺T-Zellen mit Con A 1µg/ml ist mit in weißen Balken dargestellt. Die Negativkontrollen bilden einmal APC und T-Zellen in Zellkulturmedium oder Kontrollen mit Zellkulturmedium ohne Zellen oder Zusätze (weiße Balken). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung für n=2; jedes n stellt den Mittelwert aus Duplikaten dar.

3.7 FVIII-Einzelpeptidscreening

Da jedes der 18 untersuchten FVIII-Peptidgemische zu einer spezifischen T-Zellantwort führte, musste zunächst angenommen werden, dass die eingesetzten Peptidgemische jeweils ein oder mehrere immunogene 15-mer Peptide enthielten. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wurden alle FVIII-Peptidpools weiter aufgeschlüsselt und die daraus resultierenden 240 Einzelpeptide in getrennten Ansätzen untersucht (Abb. 3.10 A). Die Mäuse wurden nach demselben Immunisierungsprotokoll behandelt, wie bei dem zuvor durchgeführten FVIII-Peptidpoolscreening.

Es zeigte sich bei diesem Experiment eine T-Zellaktivierung gegen jedes Einzelne der 240 eingesetzten FVIII-Peptide. Die Höhe der Restimulation durch die einzelnen Peptide lag hierbei in einem Bereich zwischen 19 (Peptid Nr. 30) und 69 (Peptid Nr. 219) FVIII-Peptid-spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen in 10^5 $CD4^+$ -T-Zellen. Die Mehrzahl der untersuchten Peptide ergab eine Frequenz spezifischer T-Zellen in einem Bereich von 35 bis 60 FVIII-spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen (Abb. 3.10 A). Diese Ergebnisse stellen einen Mittelwert eines Doppelansatzes pro untersuchtem Peptid dar. Als Negativkontrolle wurden $CD4^+$ -T-Zellen aus NaCl-behandelten Mäusen mit rFVIII oder FVIII-Peptid restimuliert. Hierbei zeigte sich eine geringe T-Zellaktivierung von maximal 10 FVIII-spezifischer T-Zellen in 10^5 $CD4^+$ -T-Zellen bei der Restimulation von $5\mu\text{g/ml}$ rFVIII gegenüber 33 aktivierten FVIII-spezifischen T-Zellen aus der FVIII-immunisierten Maus. Die Restimulation mit FVIII-Peptid (Peptid Nr. 13) in einer Konzentration von $1,6\mu\text{g/ml}$ führte zu einer Aktivierung von 9 FVIII-spezifischen T-Zellen in 10^5 $CD4^+$ -T-Zellen aus der NaCl-behandelten Maus und 45 FVIII-spezifischen T-Zellen in 10^5 $CD4^+$ -T-Zellen aus der FVIII-immunisierten Maus (Abb. 3.10 B).

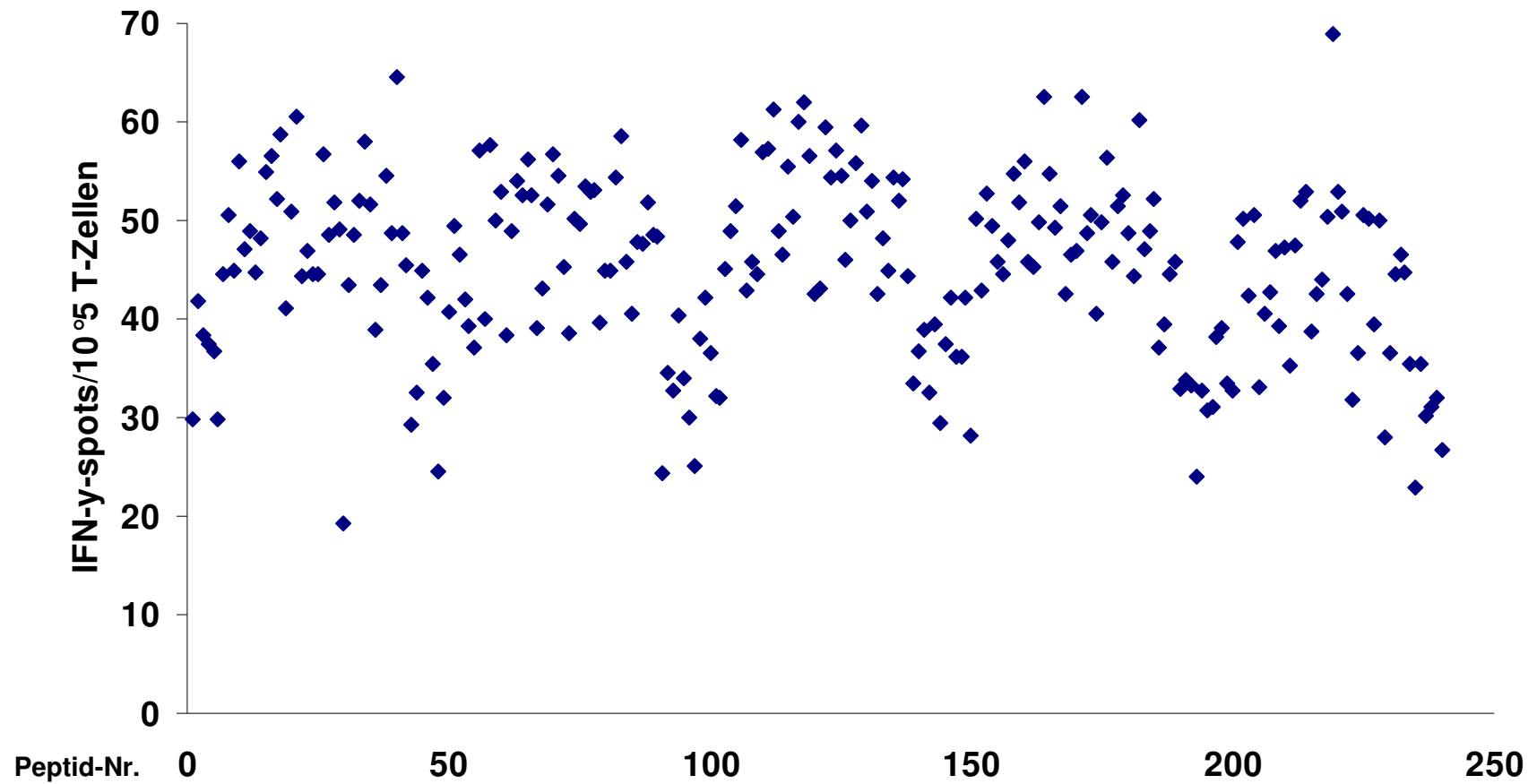


Abb. 3.10 A Restimulation FVIII-spezifischer CD4⁺-T-Zellen mit 240 unterschiedlichen FVIII-Peptiden.

Jedes FVIII-Peptid weist eine Länge von 15 AS auf, die mit jeweils 12 AS überlappen. Die 240 unterschiedlichen FVIII-Peptide wurden im Doppelansatz auf ihr FVIII-spezifisches T-Zell-Restimulationspotential untersucht.

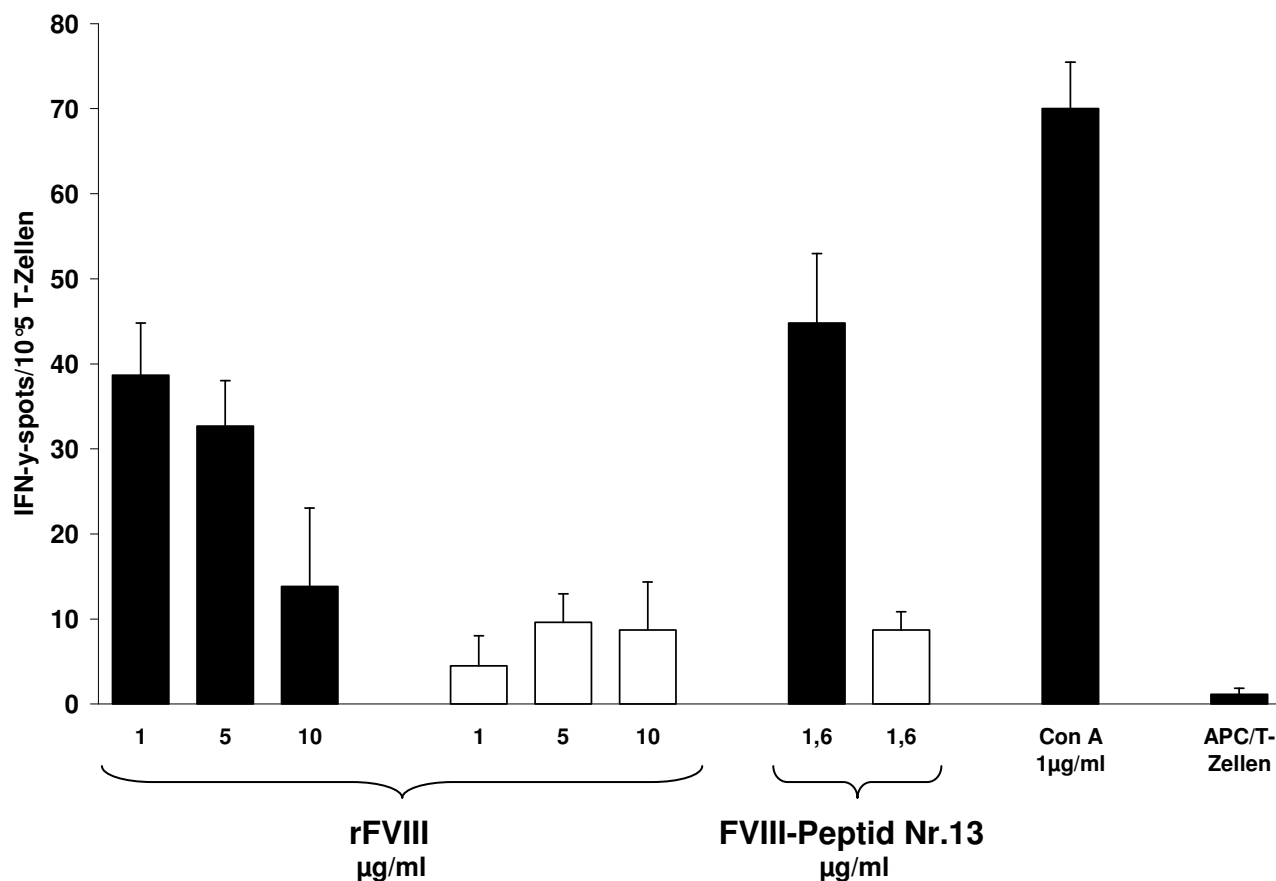


Abb. 3.10B CD4⁺-T-Zellaktivierung durch rFVIII und FVIII-Peptid.

Dargestellt ist die Anzahl der restimulierten FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellen in 10⁵ CD4⁺-T-Zellen durch rFVIII (1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml) und FVIII-Peptid Nr. 13 (1,6µg/ml).

FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellen aus der FVIII-immunisierten Maus sind in Form von schwarzen Balken dargestellt, FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellen aus der NaCl-behandelten Maus in Form von weißen Balken. Die Positivkontrolle bilden CD4⁺-T-Zellen aktiviert durch Con A 1µg/ml. Die Negativkontrollen bilden APC und T-Zellen im Zellkulturmedium. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung für n=2; jedes n stellt den Mittelwert aus Duplikaten dar.

3.8 Untersuchung der Bindungsaffinität von FVIII-Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle in FVIII-Knockout-Mäusen

Um zu untersuchen, ob die von den einzelnen Peptiden induzierte T-Zellantwort mit der Bindungsaffinität der jeweiligen 15-mere zum MHC-Klasse-II-Rezeptor der verwendeten FVIII-KO-Mäuse korreliert, wurde im Weiteren die Affinität der 240 Peptide zum MHC-Rezeptor mittels „RankPep“ berechnet. Unter Vorgabe der zu untersuchenden MHC-Matrix (I_{Ab.p.mtx}), konnte ein individueller Bindungsscore vorhergesagt werden.

Ein Wert („Score“) größer 10,75 beschreibt eine Bindungsaffinität des zu untersuchenden Peptids zu dem MHC-II-Komplex, während ein Score kleiner 10,75 eine Bindung ausschließt. Der optimal errechnete Bindungswert liegt bei 49,14. Die einzelnen FVIII-Peptide sind in aufeinander folgender Reihenfolge aufgeführt (Abb. 3.11 – 3.14). Unter Verwendung des Programms „RankPep“ konnten unter den 240 FVIII-Peptiden nur 10 verschiedene 15-mere identifiziert werden, für die eine Bindung mit dem MHC-Klasse-II-Molekül der Maus anzunehmen ist (Schwellenwert >10,75). Dies traf auf zehn FVIII-Peptide mit den Nummern 1, 2, 73, 74, 75, 89, 155, 156, 204 und 205 zu, die einen Schwellenwert zwischen 10,75 und 16,92 aufweisen. Die oben aufgeführten Peptide führten jedoch in dem zuvor durchgeführten FVIII-Peptidscreening zu keiner höheren T-Zellantwort, als Peptide mit geringerer vorhergesagter Bindungsaffinität (Peptid Nr.1 aktivierte 30 IFN- γ -sezernierende T-Zellen versus eines Bindungswertes von 16,5). Ein optimaler Bindungswert von 49,14 wurde für keines der untersuchten FVIII-Peptide vorhergesagt.

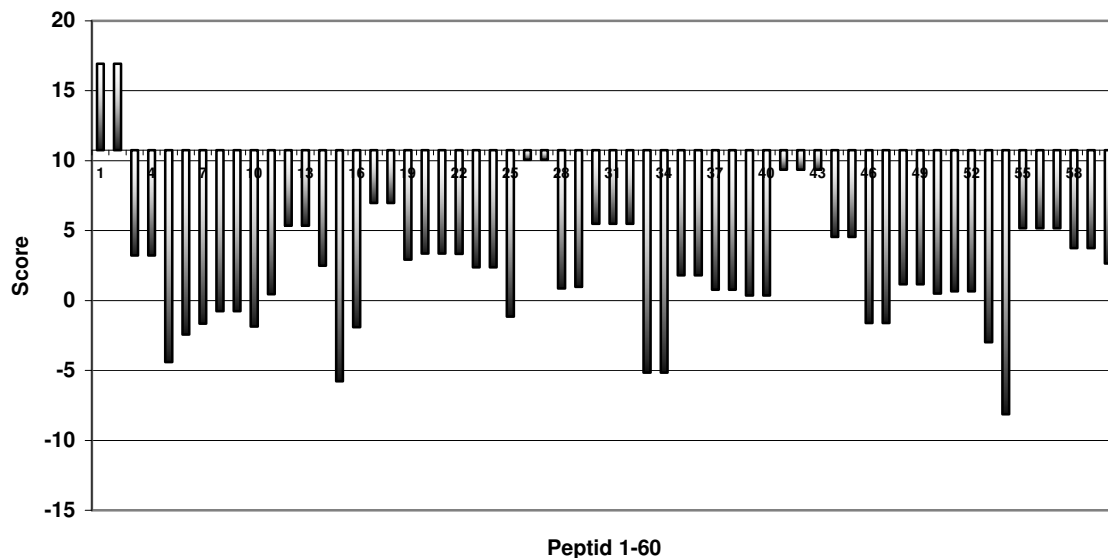


Abb. 3.11. Berechnung der Bindungsaffinität der FVIII-Peptide Nr. 1 bis Nr. 60 an seinen MHC-Klasse-II I_Ab.

Ein Wert > 10.75 beschreibt eine mögliche Bindungsaffinität des Peptids an einem MHC-Klasse-II I_Ab der FVIII-KO-Maus.

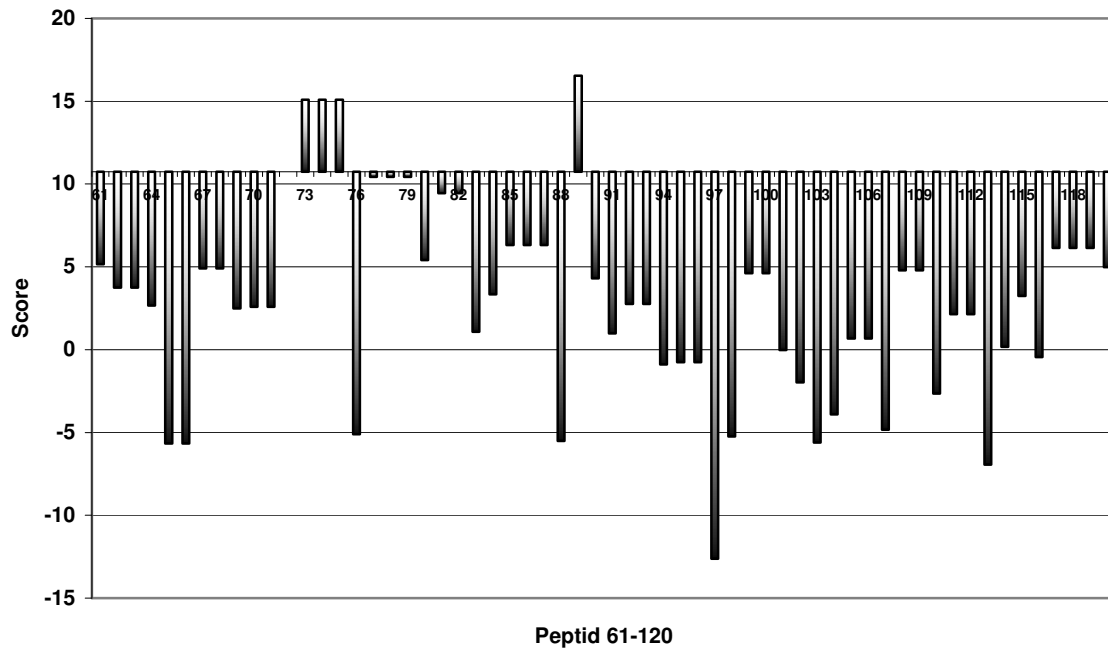


Abb. 3.12. Berechnung der Bindungsaffinität der FVIII-Peptide Nr.61 bis Nr.120 an seinen MHC-Klasse-II I_Ab.

Ein Wert > 10.75 beschreibt eine mögliche Bindungsaffinität des Peptids an einem MHC-Klasse-II I_Ab der FVIII-KO-Maus.

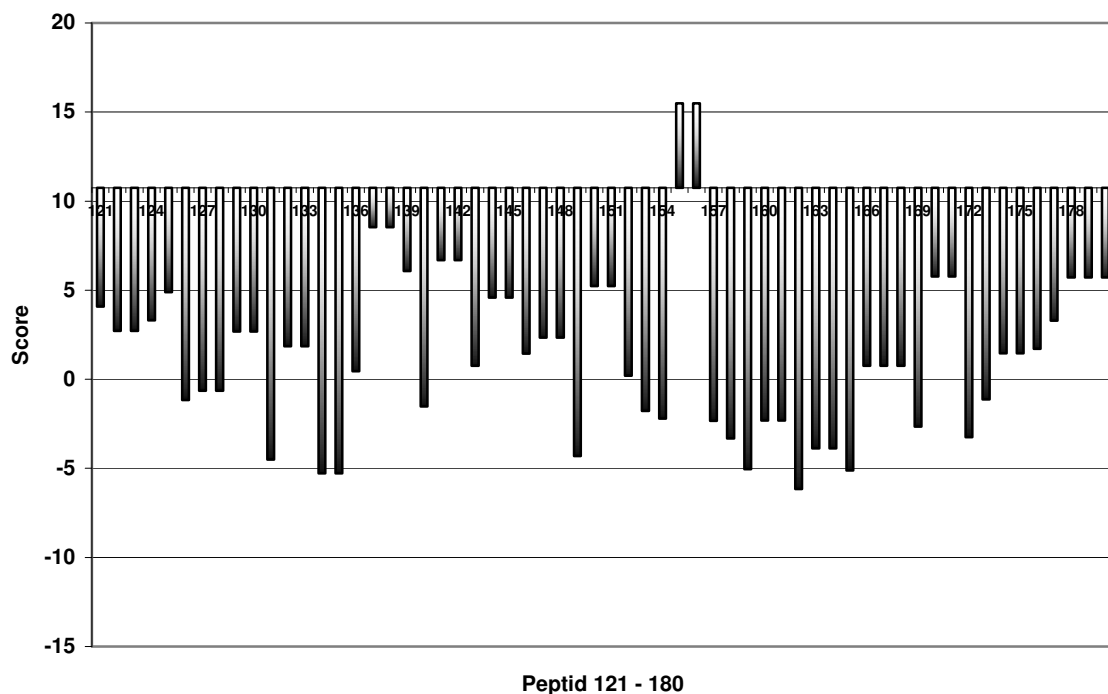


Abb. 3.13. Berechnung der Bindungsaffinität der FVIII-Peptide Nr.121 bis Nr.190 an seinen MHC-Klasse-II I_Ab.

Ein Wert > 10.75 beschreibt eine mögliche Bindungsaffinität des Peptids an einem MHC-Klasse-II I_Ab der FVIII-KO-Maus.

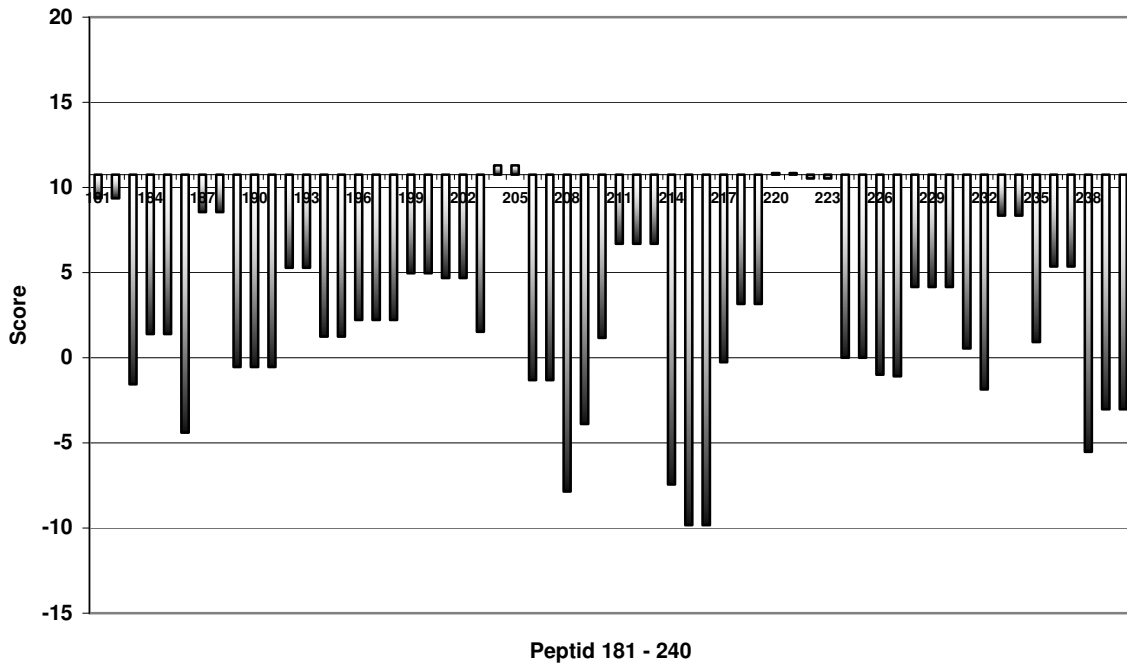


Abb. 3.14. Berechnung der Bindungsaffinität der FVIII-Peptide Nr.181 bis Nr.240 an seinen MHC-Klasse-II I_Ab.

Ein Wert > 10.75 beschreibt eine mögliche Bindungsaffinität des Peptids an einem MHC-Klasse-II I_Ab der FVIII-KO-Maus.

4 Diskussion

Antikörperreaktionen, die die Funktion des Gerinnungsfaktors VIII inhibieren können, stellen eine ernstzunehmende Komplikation bei der Substitutionstherapie von Hämophilie A-Patienten dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die komplexen immunologischen Mechanismen einer Inhibitorbildung auf Ebene der T-Helferzellen in einem hämophilen Mausmodell genauer zu untersuchen. T-Helferzellen sind für die Ausbildung einer Antikörperantwort entscheidend, weil sie B-Zellen zur Antikörperbildung anregen. Ich untersuchte, in welchem Umfang sich immunogene T-Zellepitope des humanen FVIII-Proteins identifizieren lassen, die für die Ausbildung einer T-Helferzellantwort und damit letztlich für eine Antikörperbildung gegen FVIII verantwortlich sein könnten. Folgende Fragestellung sollte im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet werden: Untersuchung der durch T-Zellen vermittelten Immunantwort im FVIII-KO-Mausmodell in Bezug auf die Ausbildung einer T_H1 - versus T_H2 - Antwort, Identifizierung immunogener $CD4^+$ -T-Zellepitope des FVIII-Proteins und Ermittlung der Frequenz FVIII antigenspezifischer $CD4^+$ -T-Zellen mittels eines Interferon- γ Elispot-Assays.

4.1 Rolle der T_H1 - und T_H2 -Zellen bei der Immunantwort gegen rFVIII

Die Charakterisierung von Zytokinen und Immunglobulinen, die bei der FVIII-Antikörperantwort beteiligt sind, ist ein guter Indikator, um die dabei vorrangig beteiligte T-Zellfraktion zu identifizieren. $CD4^+$ -T-Helferzellen beinhalten Populationen, die sich in ihrer Funktion und Zytokinsekretion unterscheiden (Abbas et al. 1996; Romagnani, 1997; Weigle & Romball, 1997). Maus- T_H1 -Zellen produzieren vorrangig IFN- γ , IL-2 sowie TNF- α , während Maus- T_H2 -Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 produzieren können (Mosmann & Sad, 1996). Im Rahmen meiner Untersuchungen fand ich bei FVIII-immunisierten FVIII-KO-Mäusen, die mit rFVIII restimuliert wurden, sowohl Elemente einer T_H1 -Antwort (IFN- γ , TNF- α), als auch einer T_H2 -Antwort (IL-5) (Abb. 3.1 und 3.2, siehe Seite 60 und 62).

Allerdings führte die *in vitro* Restimulation FVIII-sensibilisierter Milz-T-Zellen zu einer deutlich stärkeren T_H1 -Antwort. Die T_H1 -vermittelte Immunantwort hatte ihr Maximum in Bezug auf die extrazelluläre Freisetzung von IFN- γ nach einer 72-stündigen *in vitro* Restimulation mit 0,8 μ g/ml rFVIII. Ich konnte somit zeigen, dass die gewählten Immunisierungsschemata zu einer vorrangig T_H1 -vermittelten T-Zellantwort führt, was frühere Beobachtungen anderer Autoren bestätigt, die ebenfalls eine vorrangig ausgeprägte T_H1 -Antwort beobachtet haben (Sasgary et al. (2002), Hausl et al. (2004) und Bril et al. (2006)). Für die weiteren

Untersuchungen, zur Identifizierung der immunogenen Region, bzw. des immunogenen Peptids innerhalb des FVIII-Proteins, erschien es daher sinnvoll, die extrazelluläre IFN- γ -Freisetzung als Indikator für eine FVIII induzierte T-Zellaktivierung und das Epitopscreening einzusetzen. Dies ist auch vor dem Hintergrund zutreffend, dass die Immunantwort gegen substituiertes FVIII-Protein in Hämophilie-Patienten vornehmlich auf eine T_H1-Antwort zurückzuführen ist (Hu et al., 2007).

Antigenpräsentierende Zellen (APC) sind Zellen, die darauf spezialisiert sind T-Lymphozyten zu „primen“. Hierzu präsentieren sie fremde Antigene in Form von Peptide auf ihrer Zelloberfläche. Zur Ausbildung einer T-Helferzell vermittelten Immunantwort, werden die Peptide im Kontext eines MHC-Klasse-II-Moleküls präsentiert, welches von dem T-Zellrezeptor spezifischer T-Helferzellen erkannt werden kann. Die drei wichtigsten APC sind Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten, die MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Steimle et al., 1994). In Bezug auf eine Hemmkörperbildung gegen substituiertes FVIII-Protein erkennen T_H1-Zellen das lineare FVIII-Peptidfragment das von APC im Kontext von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird und stimulieren daraufhin B-Zellen, die initial klonal expandieren und im weiteren Verlauf Hemmkörper mit hoher Affinität zu FVIII sezernieren können. IFN- γ fördert die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und unterstützt die Synthese komplementbindender IgG-Subklassen (IgG1 und IgG2 bei Menschen). Der Umstand, dass Antikörperreaktionen gegen Proteinantigene die Hilfe antigenspezifischer T-Zellen benötigen, um auf dasselbe Antigen zu reagieren, wird als gekoppelte Erkennung („linked recognition“) bezeichnet. Eine B-Zelle kann in Gegenwart eines fremden Proteins erst dann zur Bildung von Antikörpern gegen ein bestimmtes Protein angeregt werden, wenn eine CD4⁺-T-Zelle, die eine Peptidspezifität aufweist, zur Produktion entsprechender T-Helferzellen aktiviert wurde.

4.2 Kinetik antigenspezifischer CD4⁺-T-Zellen in Ovalbumin-immunisierten Balb/c-Mäusen

Nachdem ich in dem von mir verwendeten Mausmodell IFN- γ als Leitzytokin der FVIII vermittelten T-Zellantwort identifizieren konnte, wurde die IFN- γ -Sekretion zur Messung der T-Zellantwort für die weiteren Untersuchungen zur Epitopspezifität verwendet. In Vorexperimenten verwendete ich zunächst Ovalbumin als Modellantigen, um die spezifische Detektion von IFN- γ produzierenden CD4⁺-Zellen und deren Kinetik im Elispot-Assay im Labor neu zu etablieren.

In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass Ova-spezifische CD4⁺-T-Zellen aus Balb/c-Mäusen, die zuvor mit Ovalbumin immunisiert wurden, nach einer 72-stündigen *in vitro* Restimulation mit Ovalbumin maximal stimuliert waren. Die zur Restimulation eingesetzte Proteinkonzentration korrelierte dabei mit der Frequenz aktivierter CD4⁺-T-Zellen und hatte ihr Maximum bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 100µg/ml. Bei diesen Versuchsbedingungen konnten 40 Ova-spezifische CD4⁺-Zellen/10⁵-T-Helferzellen (Abb. 3.3, siehe Seite 64) im Elispot-Assay gemessen werden. Eine Verlängerung der Inkubation auf insgesamt 96 Stunden führte zu keiner weiteren Steigerung der T-Zellfrequenz (Abb. 3.4 A, siehe Seite 66). Meine Daten stimmen mit den Ergebnissen von Patarca et al. (1991) überein, die Ova-spezifische T-Zellklone untersucht haben. Allerdings zogen Patarca und Kollegen in ihren Experimenten den Anstieg der IFN-γ-Genexpression als Parameter für eine T-Zellaktivierung heran. Eine maximale T-Zellaktivierung zeigte sich unter diesen Bedingungen bereits nach vierstündiger Restimulation. Im Vergleich zu meinen Ergebnissen, bei denen ich nach 72 Stunden eine optimale T-Zellrestimulation durch Ova beobachtete, könnte das von Patarca et al. beobachtete frühe Optimum einer T-Zellaktivierung dadurch begründet sein, dass eine Aktivierung der Transkription des IFN-γ Gens als Ausleseparameter verwendet wurde, während ich kumuliertes IFN-γ Zytokin im Überstand gemessen habe. Eine weitere Arbeitsgruppe (Zhang et al. 2003) konnte zeigen, dass isolierte T-Zellen aus der Milz von Balb/c-Mäusen nach drei subkutanen Immunisierungen mit Ovalbumin und einer *in vitro* Restimulation über vier Tage proliferieren und IFN-γ und IL-2 sezernieren können, bevor sich die T-Zellantwort abschwächt.

Während die oben beschriebenen Untersuchungen mit dem Gesamtprotein Ovalbumin die Versuchsanordnung in Bezug auf eine erfolgreiche Immunisierung, Restimulation und Elispot-Nachweis spezifischer Milz-T-Zellen immunisierter Balb/c-Mäuse zeigte, sollte weiterhin untersucht werden, ob die Versuchsbedingungen ebenfalls geeignet sind eine Peptid-spezifische T-Zellantwort zu detektieren. Dies wurde durch Restimulation der mit Gesamtprotein (OVA) immunisierten Mäuse mit dem für OVA bekannten immunogenen Peptid des Ovalbumins (Ova₃₂₃₋₃₃₉) untersucht. Das Ova-Peptid (Ova₃₂₃₋₃₃₉) wurde im gleichen Ansatz wie die FVIII 15-mer-Peptide als Pepspot[®] maschinell synthetisiert, so dass die Untersuchung der bekannten Ova-T-Zellantwort auch als interne Kontrolle für die Herstellung der FVIII-Peptide dienen konnte.

Es zeigte sich, dass die Restimulation der T-Zellen mit einer Ova-Peptidkonzentration von 0,8µg/ml zu einer nachweisbaren T-Zellantwort von im Mittel 20 CD4⁺-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-Zellen ± 2,56 führt, die sich durch eine Erhöhung der zur Restimulation eingesetzten Peptidkonzentration auf 1,6µg/ml weiter gesteigert werden konnte und einen Nachweis von 40 OVA-spezifischen T-Zellen/100.000 T-Helferzellen ± 2,56 erlaubte (Abb. 3.4 B, siehe Seite 66). Die Peptidkonzentration, die in meinen Experimenten notwendig war, um die

Restimulation und den Nachweis spezifischer CD4⁺-T-Zellantwort herbeizuführen, ist somit mit früheren Arbeiten vergleichbar (Moiola et al., 1994; Kaushansky et al., 2006).

4.3. Untersuchungen zur Restimulation Ovalbumin-sensibilisierter T-Helferzellen mit dem Ova-Peptid (Ova₃₂₃₋₃₃₉) in einem Gemisch irrelevanter Peptide

Das FVIII-Protein ist mit 2332 Aminosäuren ein sehr großes Protein und eine Untersuchung der T-Zellantwort gegen jedes einzelne denkbare 15-mer des FVIII-Proteins erschien zunächst nicht durchführbar. Aus diesem Grunde habe ich ein Peptidgemisch (Peptidpool) von verschiedenen 15-mer-Peptiden der jeweiligen bekannten immunogenen Region des FVIII-Proteins gebildet. Die T-Zellen sollten mit diesem FVIII-Peptidpool restimuliert werden und positive Pools durch anschließende Aufspaltung eine Identifizierung der in dem Pool möglicherweise enthaltenen immunogenen T-Zellepitope ermöglichen. Um die Sensitivität des Nachweises einer T-Zellantwort gegen ein immunogenes Peptid innerhalb des Peptidpools zu bestimmen, habe ich zunächst eine Verdünnungsreihe mit dem oben bereits erwähnten Modellantigen Ova₃₂₃₋₃₃₉ hergestellt. Hierzu wurde OVA in steigender Konzentration zu einem Gemisch von 15 FVIII-Peptiden gegeben. Anschließend wurde die gegen Ova₃₂₃₋₃₃₉ gerichtete T-Zellantwort, zuvor mit Ovalbumin immunisierter Mäuse, gegen die Peptidgemische untersucht, die eine Mischung aufsteigender Konzentrationen des relevanten Ova₃₂₃₋₃₃₉ Peptids mit irrelevanten FVIII-Peptiden enthielten. Es zeigte sich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen der Nachweis einer spezifischen T-Zellantwort gegen ein Ova-Peptid mit einer Konzentration von 2 µg/ml in einem Gemisch von 16 Peptiden und einer Gesamtproteinmenge von 0,48 µg möglich war (Abb. 3.5, siehe Seite 68). Die Sensitivität eines Nachweises Ova₃₂₃₋₃₃₉-spezifischer T-Zellen in einem Gemisch mit 15 irrelevanten FVIII-Peptiden entsprach somit in etwa einem Drittel der Proteinkonzentration, die notwendig ist, um eine maximale T-Zellantwort gegen Ova₃₂₃₋₃₃₉ zu generieren (Yip et al., 1999).

4.4. Analyse der FVIII-spezifischen T-Helferzellantwort in FVIII-Knockout-Mäusen

Nachdem die Versuchsbedingungen zunächst in Balb/c-Mäusen und mit dem Modellantigen Ova₃₂₃₋₃₃₉ optimiert wurden, sollten diese Bedingungen auf die Untersuchungen einer FVIII-spezifischen T-Zellantwort in FVIII-KO-Mäusen übertragen werden. Meine Experimente

ergaben nach wöchentlicher Immunisierung der FVIII-KO-Mäuse mit 1 µg rFVIII im Verlauf eines Monats eine starke T-Zellantwort gegen FVIII. Mit steigender Konzentration von rFVIII bei der *in vitro* Restimulation FVIII-spezifischer CD4⁺-T-Zellen zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Frequenz FVIII-sensibilisierter T-Zellen. Interessantweise nahm die Frequenz FVIII-spezifischer T-Zellen mit steigender FVIII-Proteinkonzentration bis zu einem Maximum von 0,1 µg/ml zu, um dann bei höherer Proteinkonzentration wieder abzufallen (Abb. 3.6 A, siehe Seite 70). Diese Ergebnisse bestätigen somit klinische Beobachtungen bei Hemmkörperpatienten, bei denen man durch kontinuierliche intravenöse Substitution sehr hoher FVIII-Dosierungen eine Toleranz gegen das substituierte FVIII-Protein, d.h. eine Abschwächung der Hemmkörperreaktion erreichen kann (Brackmann & Gormsen, 1977; DiMichele et al. 2002). Eine Dosisabhängigkeit der Proliferationsantwort von T-Zellen bei Hemmkörperpatienten konnte erstmals 1996 beschrieben werden. Wie auch in meiner Arbeit, konnte bei Restimulation mit höheren FVIII-Konzentrationen eine Reduktion der Proliferationsrate beobachtet werden. Das Optimum der Aufnahme radioaktiven ³H-Thymidins als Indikator für proliferierende CD4⁺-Zellen lag hier bei 2 µg/ml FVIII (Singer et al., 1996). Die in meinen Experimenten beobachtete Kinetik einer T-Zellantwort, die ihr Optimum bei einer Restimulation mit 0,1 µg/ml FVIII aufweist, ist darüber hinaus in etwa mit Beobachtungen von Reding et al. vergleichbar. Die Untersuchungen von Reding und Kollegen zur *in vitro* Proliferation von CD4⁺-T-Zellen hämophiler Patienten und gesunder Probanden gegen FVIII-Protein, zeigten ebenfalls eine dosisabhängige Restimulation der T-Helferzellen mit einem Optimum bei 0,3 µg FVIII-Protein/ml (Reding et al., 2000).

Frühere Arbeiten, die sich mit FVIII-spezifischen T-Zellreaktionen hämophiler Mäuse beschäftigten, basierten häufig auf einer Untersuchung der Proliferationskapazität *in vitro* restimulierter T-Zellpopulationen. Hierzu wurden Milz-T-Zellsuspensionen eingesetzt, die zuvor von CD8⁺-T-Zellen depletiert wurden (Singer et al., 1996; Qian et al., 1999; Rossi et al., 2001). Obwohl diese Arbeiten wertvolle Informationen zur Rolle der T-Zellen bei der Hemmkörperentwicklung lieferten, spiegeln sie nicht immer die *in vivo* - Situation wider, insbesondere erlauben sie nicht die Bestimmung der Frequenz aktivierter, FVIII spezifischer, T-Lymphozyten. Eine Studie von Laouar und Crispe (2000) zeigte, dass die Effektorfunktion von CD4⁺-Zellen nicht notwendigerweise an ihre Proliferation gekoppelt ist. Proliferationsassays sind in der Aussagekraft der T-Zellantwort limitiert. Die Untersuchung der T-Zell-Zytokinsynthese ist dagegen von größerer Bedeutung, um die Natur der FVIII spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort an einem früheren Punkt der T-Zellreaktion zu beschreiben.

4.5 Epitopmapping von T-Helferzellen pdFVIII immunisierter FVIII-Knockout-Mäuse

4.5.1 FVIII-Peptidpoolscreening

Um das Epitoprepertoire FVIII-spezifischer CD4⁺-T-Zellen weiter zu analysieren, wurden 240 FVIII-Peptide zu 18 Peptidpools gemischt. Jeder Pool setzte sich aus jeweils 9 bis maximal 15 einzelnen FVIII-Peptiden zusammen. Dabei habe ich nur die FVIII-Peptide gepoolt, die bereits bekannten immunogenen Regionen des FVIII-Proteins (a1, A2, a3, A3, C1-C2) zuzuordnen sind (Behrmann et al., 2002; Shima et al., 2006; Healey et al., 2007).

Eine Restimulation mit einem FVIII-Peptidgemisch, bestehend aus 15 unterschiedlichen FVIII-Peptiden, zeigte mit zunehmender Einzelpeptidkonzentration eine ansteigende FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellfrequenz. Das Maximum der T-Zellantwort lag hierbei bei einer Konzentration von 3µg FVIII-Peptidpool/ml (Abb. 3.6 B, siehe Seite 70). Ein erneuter Abfall in der Stärke der T-Zellantwort bei steigenden FVIII-Peptidkonzentrationen, wie dies bei hohen FVIII-Gesamtproteinkonzentrationen gesehen wurde, konnte bei den untersuchten FVIII-Peptidkonzentrationen nicht beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass die eingesetzten Peptidkonzentrationen nicht hoch genug waren um diesen Effekt herauszustellen. Höhere Peptidkonzentrationen konnten in dem Mischungsverhältnis nicht untersucht werden, da die Stammlösung der durch Synthese hergestellten und von der Firma Jerini in Berlin bezogenen FVIII-Peptide keine höhere Konzentration zulässt. Parallel mitgeführte Negativkontrollen waren ein für diesen untersuchten Mausstamm irrelevantes Ova-Peptid (Ova₃₂₃₋₃₃₉), Ovalbumin als komplettes Protein sowie ein Ansatz ohne jedes Peptid, in dem lediglich APC und T-Zellen enthalten waren. Diese Negativkontrollen zeigten keinerlei spezifische T-Zellaktivierung, was darauf schließen lässt, dass die beobachteten T-Zellreaktionen spezifisch gegen die FVIII-Pools gerichtet sind (Abb. 3.8, siehe Seite 74).

In einem weiteren Experiment habe ich alle 18 Peptidpools auf ihre Immunogenität für FVIII-immunisierte Mäuse untersucht. In diesem Experiment wurden FVIII-KO-Mäuse mit pdFVIII-Protein immunisiert und die isolierten T-Helferzellen mit den 18 verschiedenen Pools restimuliert. Die Annahme, dass die T-Zellantwort gegen einzelne Regionen im Faktor FVIII-Protein stärker ausgeprägt ist, bestätigte sich in meinen Untersuchungen nicht. Vor einigen Jahren konnten bei selektiver Analyse einzelner FVIII-Domänen humane T-Zellepitope in der A2-, A3-, C1- und C2-Domäne durch die Analyse von überlappenden Peptiden genauer beschrieben werden (Reding et al., 2003; Hu et al. 2004, Reding et al., 2004; Jones et al., 2005).

Bei dem von mir erstmals systematisch durchgeführten Epitopscreening zeigten alle untersuchten Peptidpools vergleichbare T-Zellantworten mit im Mittel 24 spezifischen

T-Zellen pro 100.000 eingesetzter T-Zellen (Abb. 3.9 A siehe Seite 77). Insgesamt wurden 240 Peptide der Regionen a1, AS 320-405; A2, AS 460-595; a2, AS 700-765; a3, AS 1630-1715; A3, AS 1790-1845; C1-C2, AS 1977-2332) (Abb. 2.1, siehe Seite 42) des humanen FVIII-Proteins auf 18 Peptidpools verteilt. a1: Pool 1-2, A2: Pool 3-5, a2: Pool 6-7, a3: Pool 8-9, A3: Pool 10, C1-C2: Pool 11-18. Innerhalb der untersuchten FVIII-Peptidpools fand sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Frequenz reaktiver T-Zellen. Die Höhe der T-Zellantwort gegen die FVIII Pools war mit der Frequenz Ova₃₂₃₋₃₃₉ spezifischer T-Zellen in Ovalbumin-immunisierten Balb/c-Mäusen früherer Experimente vergleichbar. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Con A 1 µg/ml) mit im Mittel 70 T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen war die T-Zellantwort gegen die FVIII-Pools jedoch nur schwach ausgeprägt (Abb. 3.9 B siehe Seite 78). Dies könnte darauf schließen lassen, dass in jedem Peptidpool ein oder mehrere Peptide immunogen sind, jedoch keine der untersuchten FVIII-Regionen in Bezug auf ihre Immunogenität besonders hervorstechen.

4.5.2 FVIII-Einzelpeptidscreening

Nach Analyse der 18 unterschiedlichen FVIII-Peptidpools erfolgte die weitere Aufschlüsselung dieser Peptidpools mit dem Ziel, einzelne in den Pools enthaltene immunogene FVIII-Peptide zu identifizieren. Hierzu habe ich Milz-T-Zellen FVIII-immunisierter Mäuse *in vitro* mit jedem einzelnen der 240 FVIII-Peptide restimuliert und die T-Zellantwort in einem Elispot-Assay quantifiziert. Dieses so genannte „Epitopmapping“ wurde mit einer FVIII-Peptid „Library“, bestehend aus 15 Aminosäuren (15-mer) langen FVIII-Peptiden, mit je 12 AS Überlappung, durchgeführt. Überraschenderweise führten alle eingesetzten FVIII-Peptide in den untersuchten Mäusen zu einer CD4⁺-T-Zellantwort. Diese lag im Mittel bei 47 FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen (Abb. 3.10 A siehe Seite 80). Die T-Zellantwort gegen das in einer vergleichbaren Konzentration mitgeführte humane FVIII-Protein war in etwa vergleichbar und ergab eine Frequenz von im Mittel 39 CD4⁺-T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen. Obwohl es nicht zu erwarten ist, dass sich T-Zellen gegen alle 240 FVIII-Peptide in FVIII-immunisierten Mäusen finden lassen, scheint das Ergebnis des Elislots spezifisch zu sein. So ergab die Restimulation von T-Zellen mit NaCl-behandelter Mäuse keine signifikante T-Zellaktivierung gegen die gleichen FVIII-Peptiden oder FVIII-Protein (4,5 bzw. 9 aktivierte CD4⁺-T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen) (Abb. 3.10 B siehe Seite 81). Bei weiterer Betrachtung und Analyse fällt auf, dass die Stärke der T-Zellantwort offenbar auch von der Position der Versuchsansätze auf den 96-well-Mikrotiterplatten abhängt. Versuchsansätze, die sich in den äußeren Vertiefungen im Randbereich der 96-well-Platte befanden, ergaben eine geringere T-Zellfrequenz, als die

Ansätze in zentraleren Anteilen der Mikrotiterplatte. Dieses Phänomen ist offenbar dadurch bedingt, dass in Vertiefungen am Rand der 96-well-Platten schlechtere Kulturbedingungen herrschen, als bei Kulturvertiefungen in der Mitte der 96-well-Platte. Die Experimente wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt; d.h. auf einer 96-well-Platte konnten ungefähr 48 Peptide untersucht werden. Die verminderte Sensitivität im Nachweis spezifischer T-Zellen in den äußeren Vertiefungen, könnte daher möglicherweise das wellenförmige Muster in der Abb. 3.10 A, Seite 80 erklären.

Geht man von der Annahme aus, dass jeweils nur eine T-Zelle in der Lage ist ein individuelles Antigen im Kontext des jeweiligen MHC zu erkennen, so muss man annehmen, dass die Summe der Peptid-spezifischen T-Zellen gegen jedes einzelne Peptid eines eingesetzten Peptidpools der Summe der spezifischen T-Zellen entspricht, die bei Restimulation mit dem Pool der Einzelpeptide beobachtet werden. Da in den Pools jeweils 15 Peptide zusammengefasst wurden, würde man demnach gegen das Pool soviel FVIII Antigen-spezifische T-Zellen erwarten, wie es der Summe der T-Zellen gegen die 15 im Pool eingesetzten Peptide entspricht. Eine Restimulation mit einem einzelnen FVIII-Peptid ergab im Mittel ungefähr 47 FVIII-spezifische CD4⁺-T-Zellen unter 10⁵ im Versuch eingesetzten Milz-T-Zellen. In einem FVIII-Peptidpool (Gemisch aus bis zu maximal 15 einzelnen FVIII-Peptiden) hätten demnach $47 \times 15 = 705$ FVIII-spezifische T-Zellen nachzuweisen sein müssen, wenn jede T-Zelle jeweils nur ein T-Zellepitop erkennen kann.

Da in meinen Experimenten die Frequenz der T-Zellen gegen jedes einzelne der 240 untersuchten Peptide der Frequenz gegen das Peptidpoolgemisch und auch gegen das FVIII-Protein entsprach, muss man darauf schließen, dass jede FVIII-spezifische T-Zelle gegen alle FVIII-Peptide reagiert und durch diese restimuliert werden kann. Ein derartiges Phänomen ist für T-Helferzellen bisher nicht beschrieben. Bei zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen ist das Phänomen eines Superantigens bekannt, bei dem die für ein Antigen spezifischen T-Zellen auch gegen ähnliche Epitope aktiv sind und durch diese restimuliert werden können. Möglicherweise deuten die Ergebnisse des T-Zellepitop-Mappings dieser Arbeit daraufhin, dass FVIII ähnlich wie ein „Superantigen“ wirkt. Um dies jedoch sicher verifizieren zu können, wären weitere Untersuchungen mit T-Zellklonen notwendig, die sicher zeigen könnten, dass eine T-Zelle in der Lage ist, verschiedene Peptide zu erkennen.

Theoretisch könnten die Ergebnisse des T-Zellepitop-Mappings mit den 240 Peptiden auch einen Artefakt darstellen, der z.B. von einer Kontamination der durch Synthese hergestellten Peptide verursacht wurde und die zu einer unspezifischen Stimulation der T-Zellen führte. Allerdings schließen die mitgeführten Kontrollen dieses weitgehend aus. So führte das gleiche Peptidgemisch in Mäusen, die zuvor nicht mit FVIII immunisiert, wurden zu keiner signifikanten T-Zellantwort. Bei der Herstellung der FVIII-Peptide wurde in gleichem Ansatz das für Hämophilie-Mäuse irrelevante Ova₃₂₃₋₃₃₉ Peptid mitgeführt. Dieses Peptid wurde in den Ansätzen zur Untersuchung der T-Zellantworten FVIII-immunisierter Mäuse im Elispot mitgeführt. Eine Kontamination der synthetisch hergestellten Peptide als Ursache für die T-Zellantworten, hätte auch gegen das Ova-Peptid zu einer T-Zellantwort geführt. Dies war in den mit FVIII immunisierten Hämophilie-Mäusen jedoch nicht der Fall und lässt vermuten, dass die Ergebnisse valide sind.

Bisherige Publikationen zeigen, dass Peptide mit einer Länge von fünfzehn Aminosäuren und einer Überlappung von 12 AS, wie sie in meinen Experimenten eingesetzt wurden, für eine Analyse antigenspezifischer T-Zellantworten geeignet sind (Maecker et al., 2001; Kiecker et al., 2004). Es wird jedoch auch beschrieben, dass ein Peptidscreening mit vielen kurzen Peptiden zu einer Kreuzreaktivität des T-Zellrezeptors mit verschiedenen oder nicht verwandten AS-Sequenzen führen kann, die nicht spezifisch sind, aber dennoch eine Aktivierung der T-Zellen zeigen können (Mason, 1998). Ich kann nicht sicher ausschließen, dass ein derartiges Phänomen auch dem Ergebnis des Epitopscreenings mit FVIII-Peptiden zugrunde liegt, obwohl eine Länge von 15 AS, wie oben beschrieben, als ausreichend angesehen werden kann.

Aus Untersuchungen (Reding et al., 1999; Reding et al., 2000) ist bekannt, dass CD4⁺-Zellen von Hemmkörperpatienten eine Immunantwort auf prozessierte Peptide der meisten FVIII-Domänen aufweisen können. Neben den T-Zellepitopen sind im FVIII-Protein ebenfalls viele Epitope beschrieben, die als Bindungsstellen für inhibitorische Antikörper dienen und sich auch mit T-Zellepitopen überschneiden können (Barrow et al., 2001; Reding et al., 2003; Reding et al., 2004). Diese Studien zeigen, dass T- und B-Zellen, die in der Hemmkörpersynthese eine Rolle spielen, FVIII-Epitope erkennen, die in unmittelbarer Nähe zueinander liegen können. Neben den beschriebenen inhibitorischen Antikörpern (Hemmkörper) existieren auch gegen FVIII gerichtete Antikörper, die zu keiner Beeinträchtigung der Proteinfunktion führen (Nilsson et al., 1990; Gilles et al. 1993).

Denkbar ist auch, dass die beobachtete Frequenz von 47 FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellen unter 10⁵ CD4⁺-T-Zellen eine Art „Hintergrundrauschen“ darstellt und die T-Zellantwort gegen einzelne, vielleicht sonst stärker ausgeprägte Epitope nicht zum Tragen kommt. Dies hätte

dann der Fall sein können, wenn die über eine Dauer von 10 Tagen täglich durchgeführte intravenöse Immunisierung der Mäuse zu hohen, eine Toleranz induzierenden FVIII-Spiegeln geführt hätte. Dies ist bei den von mir gewählten FVIII-Immunisierungsschema allerdings weitgehend ausgeschlossen. So habe ich in meinen Experimenten eine Immunisierungsdosis gewählt, die mit der Therapie von Hämophilie A-Patienten vergleichbar ist (1IU pdFVIII in 50µl NaCl pro 10g Körpergewicht). Dieses Immunisierungs-Schema führt in so behandelten Mäusen zu einer therapeutisch relevanten Immunantwort mit der Ausbildung von FVIII-Hemmkörpern (Behrmann et al., 2002). Gegen eine Toleranzinduktion spricht auch, dass sich in meinen Versuchen eine deutlich ausgeprägte T-Zellantwort gegen das FVIII-Gesamtprotein nachweisen lies.

Untersuchungen von Reding (Reding et al., 2004) haben bei der Analyse der humanen A3-Domäne des FVIII-Proteins eine T-Zellantwort auf alle FVIII-Peptide dieser Domäne bei gesunden Individuen zeigen können. Es ist erstaunlich, dass gesunde Probanden in dieser Arbeit von Reding die höchste proliferative Antwort bei einem heterogenen Reaktionsmuster auf fast alle zu untersuchenden A3-Peptide zeigten. Die breite Aktivierung von CD4⁺-Zellen in dieser Gruppe wurde mit der ständigen Verfügbarkeit von endogenem FVIII im Blut von gesunden Menschen und der damit verbundene größeren Wahrscheinlichkeit der Sensibilisierung von T-Zellen durch Antigenprozessoren gesehen. Interessanterweise konnten Reding et al zeigen, dass Patienten mit schwerer Hämophilie und der damit verbundenen geringen FVIII-Plasmakonzentration, eine T-Zellantwort aufweisen, die sich auf einige immundominante Regionen des FVIII-Proteins beschränkt. Meine Experimente zu FVIII-spezifischen CD4⁺-T-Zellen FVIII immunisierter Hämophilie-Mäuse, wurden mit humanem FVIII durchgeführt. Die FVIII-E17-KO-Mäuse verfügen noch über geringe Mengen inaktives murines FVIII (Bi et al. 1996). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das E-17-KO-Mausmodell geeignet ist, die Immunantwort gegen humanes FVIII zu untersuchen (Reipert et al., 2000a; Wu et al., 2001; Behrmann et al., 2002). Homologien bestehen in den funktionell wichtigen Domänen A und C zu 84% - 93%, aber nur zu 42% - 70% in der nicht funktionell wichtigen B-Domäne und den sauren Regionen (Elder et al., 1993, Emeiss et al. 2007). Für weitere Analysen wäre es auch denkbar, einen Mausstamm der das E-16- oder E-17-Transgen enthält mit einem zusätzlichen Transgen für die humanen MHC-Klasse-II-Moleküle zu generieren (Woods et al., 1994).

Ein Peptidscreening für das im Kontext von MHC-Klasse-II präsentierte FVIII-Protein, führte in meinen Untersuchungen zu einem Nachweis spezifischer T-Zellen gegen alle eingesetzten FVIII-Peptide. Ich isolierte dafür CD4⁺-T-Zellen von Geschwistertieren

5 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793

Acuto O, Cantrell D (2000). T cell activation and the cytoskeleton. *Ann Rev Immunol* 18, 165-184

Algiman M, Dietrich G, Nydegger UE, Boieldien D, Sultan Y, Kazatchkine MD (1992). Natural antibodies to FVIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3795-3799

Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C (2000). Canonical structures for the hypervariable regions of T cell $\alpha\beta$ receptors. *J Mol Biol* 295, 979-995

Ansel KM, Lee DU, Rao A (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 4, 616-623

Antonarakis SE (1998). Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and haemophilia A. *Haemophilia* 4 (Suppl 2), 1-11

Antunes SV (2002). Haemophilia in the developing world: the Brazilian experience. *Haemophilia* 8, 199-204

Appelman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA (2000). CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 164, 144-151

Arai M, Scandella D, Hoyer LW (1989). Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid. *J Clin Invest* 83, 1978-1984

Avrameas S (1991). Natural antibodies: from "horror autotoxicus" to "gnothi seaution". *Immunol Today* 12 (5), 154-158

Balague C, Zhou J, Dai Y, Alemany R, Josephs SF, Andreason G, Hariharan M, Sethi E, Prokopenko E, Jan HY, Lou YC, Hubert-Leslie D, Ruiz L, Zhang WW (2000). Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 95, 820-828

Battle J, Gomez E, Rendal E (1996). Antibodies to factor FVIII in plasma of patients with hemophilia A and normal subjects. *Ann Hematol* 72, 321-326

Barrow RT, Healey JF, Jacquemin MG, Saint-Remy JM, Lollar P (2001). Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood* 97, 169-174

Barry M, Bleackley RC (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2 (6), 401-9

Begemann M (1999). *Praktische Hämatologie: Klinik – Therapie – Methodik* (11. Aufl.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 429-502

Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy JM, Koitischke R, Kloft M (2002). Von Willebrand Factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse Model. *Thromb Haemost* 88, 221-229

- Bentley GA, Boulot G, Karjalainen K, Mariuzza RA (1995). Crystal structures of the b chain of a T cell antigen receptor. *Science* 267 (5206), 1984-1987
- Bentley GA, Mariuzza RA (1996). The structure of T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 14, 563-590
- Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W (2004). *Innere Medizin* (5. Auflage). Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 1008-1013
- Berntorp E (1996). The treatment of haemophilia, including prophylaxis, constant infusion and DDAVP. *Bailliere's Clin Haematol* 9, 259-271
- Berntorp E (1997). Second generation, B-Domain deleted recombinant factor VIII. *Thromb Haemost* 78, 256-260
- Bjorkman PJ, Parham P (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59, 253-288
- Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr (1995). Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet* 10, 119-121
- Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, Bedian V, Kazazian HH Jr (1996). Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood* 88, 3446-3450
- Bidwell E (1966). Antibody nature of the inhibitor to antihemophilic globulin (factor 8). *Nature* 210, 746-747
- Bihoreau N, Pin S, de Kersabiec AM, Vidot F, Fontaine-Aupart MP (1993). Metal identification in human anti-hemophilia A factor (factor VIII). *C R Acad Sci III* 316, 536-539
- Boggio LN, Green D (2001). Acquired hemophilia. *Rev Clin Exp Hematol* 5, 389-404
- Bolton-Maggs PHB, Stobart K, Smyth RL (2004). Evidence-based treatment of haemophilia. *Haemophilia* 10 (Suppl 4), 20-24
- Borish, Larry C, Steinke, John W (2003). Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111 (Suppl 2), 460-475
- Bosma MJ, Carroll AM (1991). The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9, 323-350
- Bowen DJ (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 55, 127-144
- Brackmann HH, Gormsen J (1977). Massive factor-VIII infusion in a haemophiliac with factor-VIII inhibitor, high responder. *Lancet* 2, 933
- Brackmann HH, Effenberger E, Hess L, Schwaab R, Oldenburg J (2000). NovoSeven in immune tolerance therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 11 Suppl 1, 39-44
- Bray GL, Gomperts ED, Courter S et al, (1994). A multicenter study of recombinant factor VIII (Recombinate): Safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. *Blood* 83, 2428-2435

- Bril WS, van Helden PM, Hausl C, Zuurveld MG, Ahmad RU, Hollestelle MJ, Reitsma PH, Fijnvandraat K, van Lier RA, Schwarz HP, Mertens K, Reipert BM, Voorberg J (2006). Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost* 95, 341-347
- Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Samersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19, 375-396
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364 (6432), 33-39
- Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol* 81, 435-440
- Cammarota G, Schierle A, Takacs B, Doran D, Knorr R, Bannworth W, Guardiola J, Sinigaglia F (1992). Identification of a CD4 binding site on the b2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* 356, 799-801
- Cantrell D (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14, 259-274
- Cash JD, Gader AM, da Costa J (1974). The release of plasminogen activator and factor VIII to lysine vasopressin, arginine vasopressin, l-deamino-8-D-arginine vasopressin, angiotensin and oxytocin in man. *Br J Haematol* 27, 363-364
- Chuah MKL, Schiedner G, Thorrez L, Brown B, Johnston M, Gillijns V, Hertel S, Van Rooijen N, Lillicrap D, Collen D, VandenDriessche T, Kochanek S (2003). Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 101, 1734-1743
- Cochrane JR, Aivazian D, Cameron TO, Stern LJ (2001). Receptor clustering and transmembrane signalling in T cells. *Trends Biochem Sci* 26, 304-310
- Cohen AJ, Kessler CM (1996). Acquired inhibitors. *Baillieres Clin Haematol* 9, 331-354
- Connelly S, Lyons RM, McClelland A, Kaleko M (1996). Sustained expression of therapeutic levels of human factor VIII in mice. *Blood* 87, 4671-4677
- Connelly S, Andrews JL, Gallo AM, Kayda DB, Qian J, Hoyer L, Kadan MJ, Gorziglia MI, Trapnell BC, McClelland A, Kaleko M (1998). Sustained phenotypic correction of murine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 91, 3273-3281
- Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 182, 1591-1596
- Constant SL, Bottomly (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell response: The alternative approach. *Ann Rev Immunol* 15, 297-322
- Cuthbert RJ, Ludlam CA, Steel CM, Beatson D, Peutherer JF (1992). Immunological studies in HIV seronegative haemophiliacs: relationships to blood product therapy. *Br J Haematology* 80, 784-791.

- DeFranco AL (1987). Molecular aspects of B lymphocyte activation. *Annu Rev Cell Biol* 3, 143-178
- Dietz HC, Valle D, Francomano CA, Kendzior RJ Jr, Pyeritz RE, Cutting GR (1993). The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations. *Science* 259, 680-682
- DiMichele DM, Kroner BL (2002). The North American Immune Tolerance Registry: practice, outcomes, outcome predictors. *Thromb Haemost* 87, 52-57
- Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 25, 505-512
- Elder B, Lakich D, Gitschier J (1993). Sequence of the murine factor VIII cDNA. *Genomics* 16, 374-379
- Emeis JJ, Jirouskova M, Muchitsch EM, Shet AS, Smyth SS, Johnson GJ (2007). A guide to murine coagulation factor structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 5(4), 670-679
- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T, Karckhardt B, Kornhuber B (1992). Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 339, 594-598
- Evatt BL, Farrugia A, Shapiro AD, Wilde JT (2002). Haemophilia 2002: emerging risks of treatment. *Haemophilia* 8, 221-229
- Ewenstein B, Hoots W, Lusher J, DiMichele D, White GC, Adelman B, Nadeau K (2000). Inhibition of CD 40 ligand (CD154) in the treatment of FVIII inhibitors. *Haematologica* 85, 35-39
- Farrer MA, Schreiber RD (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611
- Farrugia A (2002). Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease from factor concentrates: current perspectives. *Haemophilia* 8, 230-235
- Fay PJ (1999). Regulation of factor VIIIa in the intrinsic factor Xase. *Thromb Haemost* 82, 193-200
- Fields BA, Ober B, Malchiodi EL, Lebedeva MI, Ysem X, Ward ES, Mariuzza RA (1995). Crystal structures of the V α domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270 (5243), 1821-1824
- Forth W (1996). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. (7.Auflage). Spektrum Verlag, München
- Foster PA, Fulcher CA, Houghton RA, de Graaf Mahoney S, Zimmermann TS (1990). A murine monoclonal anti-factor VIII inhibitory antibody and two human factor VIII inhibitors bind to different areas within a twenty amino acid segment of the acid region of factor VIII heavy chain. *Blood* 9, 9-15
- Fowler WE, Fay PJ, Arvan DS, Marder VJ (1990). Electron microscopy of human factor V and factor VIII: correlation of morphology with domain structure and localization of factor V activation fragments. *Proc Natl Acad Sci* 87, 7648-7652

- Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA (1999). Dynamics and requirements of T cell clonal expansion *in vivo* at the single cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 162, 5212-5223
- Hausl C, Ahmad RU, Schwarz HP, Muchitsch EM, Turecek PL, Dorner F, Reipert BM (2004). Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* 104, 115-122
- Hay CRM, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, Goodeve AC, Colvin BT, Hill FGH, Preston FE, Peake IR, for the UKHC-DO Inhibitor Working Party (1997). HLA class II profile. A weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *Thromb Haemost* 77, 234-237
- Hay CRM (1998). Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* 4, 558-563
- Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Langley TJ, Church WR, Lollar P (2007). The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost* 5, 512-519
- Heemskerk JWM, Bevers E, Lindhout T (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88, 186-193
- Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D (1997). *Roche Grundkurs Hämatologie*. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, pp. 320-373
- Hoffman RW, Takeda Y, Sharp GC, Lee DR, Hill DL, Kaneoka H, Caldwell CW (1993). Human T cell clones reactive against U-small nuclear ribonucleoprotein autoantigens from connective tissue disease patients and healthy individuals. *J Immunol* 151, 6460-6469
- Hodge G, Han P (2001). Factor VIII concentrate inhibits T helper type 2 cytokine production *in vitro*: relevance to inhibitory antibody formation. *Haemophilia* 7, 490-496
- Hodge G, Flower R, Han P (1999). Effect of factor VIII concentrate on leucocyte cytokine production: characterization of TGF-beta as an immunomodulatory component in plasma-derived factor VIII concentrate. *Br J Haematol* 106, 784-791
- Holzer U, Kwok WW, Nepom GT, Buckner JH (2002). Differential antigen sensitivity and costimulatory requirements in human Th1 and Th2 antigen-specific CD4+ cells with similar TCR avidity. *J Immunol* 170, 1218-1223
- Houghten RA (1985). General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15), 5131-5.
- Hoyer LW (1994). Hemophilia A. *N Eng J Med* 330, 38-47
- Hoyer LW, Scandella D (1994). Factor VIII inhibitors: structure and function in autoantibody and hemophilia A patients. *Semin Hematol* 31, 1-5
- Hoyer LW (1995). Why do so many haemophilia A patients develop an inhibitor? *Br J Haem* 90, 498-501
- Hu GL, Okita DK, Conti-Fine BM (2004). T cell recognition of the A2 domain of coagulation factor VIII in hemophilia patients and healthy subjects. *J Thromb Haemost* 2, 1908-1917

desselben Wurfes und Geschlechts. Bei gleichem genetischen Hintergrund, FVIII-Gendefekt und MHC-Repertoire der Inzuchttiere wurden die isolierten Milz-CD4⁺-T-Zellen als Kontrollen ohne Zugabe eines Mitogens, eines spezifischen Peptids oder Proteins inkubiert und zeigten keine erhöhte T-Zellaktivierung, so dass angenommen werden muss, dass die T-Zellantwort gegen FVIII-Peptide in den mit FVIII-Gesamtprotein behandelten Mäusen spezifisch ist; bisher ist allerdings wenig über die Peptidspezifität MHC-Klasse-II restringierter T-Zellantworten bekannt. Es zeigt sich, dass im Vergleich zu MHC-Klasse-I restringierten Peptiden (z.B. Viruspeptide), bei denen oftmals wenige immundominante Peptide für die Ausbildung einer CD8⁺-T-Zellantwort verantwortlich gemacht werden können, die gegen FVIII gerichtete T-Helferzellantwort nicht derart eindeutig einem Peptid zuzuordnen ist.

4.6 Vorhersage der FVIII-Peptidbindung an MHC-Klasse-II-Moleküle der FVIII-Knockout-Maus

Um zu untersuchen, ob die beobachtete T-Zellantwort gegen alle 240 eingesetzten FVIII-Peptide auch mit der Bindung der Peptide im Kontext vom MHC-Klasse-II des untersuchten Mausstamms (H-2b) einhergeht, habe ich mit der Software „RankPep“ die individuellen Bindungsaffinitäten der einzelnen FVIII-Peptide berechnet. Eine CD4⁺-T-Zelle erkennt ein stimulierendes Peptid nur dann, wenn dieses an eine passende allele Variante eines MHC-Moleküls gebunden ist (Fremont et al., 1992). MHC-II-Moleküle werden auf der Oberfläche von B-Zellen, Makrophagen, anderen antigenpräsentierenden Zellen und epithelialen Zellen des Thymus exprimiert (Steimle et al., 1994). T-Zellen reagieren immer auf kurze, zusammenhängende Aminosäuresequenzen, die in der nativen Struktur von Proteinen häufig verborgen sind. Meine Berechnungen ergaben, dass lediglich 10 der 240 untersuchten FVIII-Peptide eine Bindungsaffinität zum MHC-Klasse-II aufweisen. Die übrigen haben kleinere oder negative Bindungsscores, die nicht für eine Bindung des untersuchten Peptids im MHC-Klasse-II Kontext sprechen. Ein optimaler Bindungsscore konnte für keines der untersuchten FVIII-Peptide vorhergesagt werden.

- Fremont DH, Matasumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson J (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2k^b. *Science* 257, 919-927
- Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J (1996a). Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272, 1001-1004
- Fremont DH, Rees WA, Konzono H (1996b). Biophysical studies of T cell receptors and their ligands. *Curr opin Immunol* 8, 93-100
- Friedl P, Brocker EB (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol Rev* 186, 83-89
- Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Roberts JR, Kasper CK, Zimmerman TS (1985). Localization of human FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *Proc Natl Acad Sci* 82, 7728-7732
- Gaffen SL (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14, 63-77
- Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA (1996). Anab T cell receptor at 2,5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219
- Gatti L, Mannucci PM (1984). Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb Haemost* 51, 379-384
- Giangrande PLF (1998). Hepatitis in haemophilia. *Br J Haematol* 103, 1-9
- Gill JC (1999). The role of genetics in inhibitor formation. *Thromb Haemost* 82, 500-504
- Gilles JG, Arnout J, Vermylen J, Saint-Remy JM (1993). Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* 82, 2452-2461
- Gilles JG, Saint-Remy J (1994). Healthy subjects produce both anti-factor VIII and specific anti-idiotypic antibodies. *J Clin Invest* 94, 1496-1505
- Gilles JGG, Jacquemin MG, Saint-Remy JM (1997). Factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 78, 641-646
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312, 326-330
- Gitschier J (1988). Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia. *Am J Hum Genet* 43, 274-279
- Green D, Lechner K (1981). A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to factor VIII. *Thromb Haemost* 45, 200-203
- Grewal IS, Flavell RA (1996). The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153, 85-106
- Großmann R, Geisen U, Schwender S et al (1999). Diagnostik und Therapiesteuerung bei erworbenen Faktoreninhibitoren. *J Lab Med* 23, 70-78

- Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM (2007). Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 97(5), 788-94
- Idriss HT, Naismith JH (2000). TNF α and the TNF receptor superfamily: structures-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50, 184-195
- Ingerslev J, Sneppen O, Hvid I, Fredberg U, Kristensen HL, Sindet-Petersen S (1999). Treatment of acute bleeding episodes with rFVIIa. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 42-46
- Ito Y, Nieda M, Uchigata Y, Nishimura M, Tokunaga K, Kuwata S, Obata F, Tadokoro K, Hirata Y, Omori Y, Juri T, (1993). Recognition of human insulin in the context of HLA-DRB1*0406 products by T cells of insulin autoimmune syndrome patients and healthy donors. *J Immunol* 151, 5880-5776
- Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, Vander Elst L, Hoylaerts MF, Bakkus M, Thielemans K, Arnout J, Peerlinck K, Gilles JG, Vermynen J, Saint-Remy JM (1998). Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* 92, 496-506
- Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, Desqueper B, Vander Elst L, Lavend'homme R, d'Oiron R, Schwaab R, Bakkus M, Thielemans K, Gilles JG, Vermynen J, Saint-Remy JM (2000). A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 95, 156-163
- Jacquemin M, Vantomme V, Buhot C, Lavend'homme R, Buny W, Demotte N, Chaux P, Peelinck K, Vermynen J, Maillere B, van der Bruggen P, Saint-Remy JM (2003). CD4+ T cell clones specific for wild-type FVIII: a molecular mechanism responsible for higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate haemophilia A. *Blood* 101, 1351-1358
- Jaiswal AI, Croft M (1997). CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells. *J Immunol* 158, 2282-2291
- Janeway CA, Medzhitov R (2002). Innate Immune Response. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (6th Edn), Garland Science Publishing, New York und London
- Jones E (1997). MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9, 75-79
- Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP (2005). Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost* 3, 991-1000
- Kägi B, Ledermann K, Bürki R (1994). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 12, 207-232
- Kane WH, Davie EW (1986). Cloning of a cDNA coding for human factor V. A blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Aca Sci* 83, 6800-6804
- Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW (1987). Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of repeats. *Biochemistry* 26, 6508-6514

Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, van Eys J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Levine P, Lazerson J, McMillan C, Penner J, Shapiro S, Shulman NR (1975). Proceedings: a more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thrombosis Diathesis Haemorrh* 34, 869-872

Kasper CK (2000). Hereditary plasma clotting factor disorders and their management. *Haemophilia* 6 (Suppl 1), 13-27

Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, Moussalli M (1997). Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 8 (Suppl 2), 3-14

Kaufman RJ (1999). Advances toward gene therapy for hemophilia at the millenium. *Hum Gene Ther* 10, 2091-2107

Kaushansky N, Zhong MC, Kerlero de Rosbo N, Hoefftberger R, Lassmann H, Ben-Nun A (2006). Epitope specificity of autoreactive T and B cells associated with experimental autoimmune encephalomyelitis and optic neuritis induced by oligodendrocyte-specific protein in SJL/J mice. *J Immunol* 177 (10), 7364-7376

Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian HG, Scott AF, Phillips D, Antonarakis SE (1988). A novel mechanism of mutation in man: hemophilia A due to de novo insertion of L1 sequences. *Nature* 332, 164-166

Kellerman S, McCormick D, Freeman S, Morris J, Conti-Fine BM (1995). TSH receptor sequences recognized by CD4⁺ cells in Graves`disease patients and in healthy controls. *J Autoimmun* 8, 685-698

Kemball-Cook G, Tuddenham EGD, Wacey AI (1998). The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 26, 216-219

Kessler CM, Ludlam CA (1993). The treatment of acquired factor VIII inhibitors: Worldwide experience with porcine factor VIII concentrates. *Semin Hematol* 30 (2) (Suppl 1), 22-27

Key NS (2004). Inhibitors in congenital coagulation disorders. *Br J Haematol* 127, 379-391

Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert R, Kern F (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides - what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol* 65 (5), 523-536

Kjalke M, Heding A, Talbo G, Persson E, Thomsen J, Ezban M (1995). Amino acid residues 721-729 are required for full factor VIII activity. *Eur J Biochem* 234, 773-779

König R, Huang LY, Germain R (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogues to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356, 796-798

Koschinsky ML, Funk WD, van Ooar BA, MacGillivray RTA (1986). Complete cDNA sequence of human pre-ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5086-5090

Kramer A, Schneider-Mergener J (1998). Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods Mol Biol* 87, 25-39

Kreuz W, Escuriola-Ettingshausen C, Martinez-Saguer I, Kaiml M, Kornhuber B (1999). Epidemiology of inhibitor development in haemophilia A patients treated with virus-inactivated plasma-derived clotting factor concentrates. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 3-8

- Kuwana M, Medsger TA Jr, Wright TM (1995). T cell proliferation response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest* 96, 586-596
- Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A, Sultan Y, Hoebeke J, Kazatchkine MD, Kaveri SV (1999). Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nature Medicine* 5, 1044-1047
- Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J, Artaud C, Drayton B, Kaveri SV, Kazatchkine MD (2002). Pathophysiology of inhibitors to FVIII in patients with haemophilia A. *Haemophilia* 8, 273-279
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2, 487-492
- Laouar Y, Crispe IN (2000). Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4+ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 13, 291-301
- Lee CA (1996). Transfusion-transmitted disease. *Bailliere's Clin Haematol* 9, 369-394
- Lee C (1999). Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia. *Thromb Haemost* 82, 516-524
- Lehner JL, Cresswell P (1996). Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 8, 59-67
- Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant PW, Ploegh HL, Lagaudrière-Gesbert C (2002). A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 14, 15-21
- Lenshow DJ, Walunas JA (1996). CD28/B7 System of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K (1998). The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 92, 3983-3996
- Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K (1989). The interaction between human blood-coagulationfactor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J* 257, 679-683
- Lieberman J (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3, 361-370
- Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501
- Lollar P, Parker ET, Curtis JE, Helgerson SL, Hoyer LW, Scott ME, Scandella D (1994). Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest* 93, 2497-2504
- Lollar P (1997). Analysis of factor VIII inhibitors using hybrid human/porcine Factor VIII. *Thromb Haemost* 78,647-651
- Lollar P (1999). Characterization of factor VIII B-cell inhibitory epitopes. *Thromb Haemost* 82, 505-508

- Lollar P (2004). Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost* 2, 1082-1095
- Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, Nichols TC, Bellinger DA, Read M, Morgan RA (2002). The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12991-12996
- Lubahn BC, Ware J, Stafford DW, Reisner HM (1998). Identification of a FVIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor. *Blood* 73, 497-499
- Lusher JM, Arkin S, Abildgaard CF, Schwartz RS (1993). Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group. *N Eng J Med* 328, 453-459
- MacLennan ICM, Gulbranson-Judge A, Toellner KM, Casamayor-Palleja M, Chan E, Sze DMY, Luther SA, Orbea HA (1997). The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop. *Immunol Rev* 156, 53-66
- Madhok R, Smith J, Jenkins A, Lowe GD (1991). T cell sensitization to factor VIII in haemophilia A? *Br J Haematol* 79, 235-238
- Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, Persaud N, Trigona W, Fu TM, Sinclair E, Bredt BM, McCune JM, Maino VC, Kern F, Picker LJ (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *Journal of Immunol Methods* 255, 27-40
- Malissen B, Malissen M (1996). Functions of TCR and PreTCR subunits: Lessons from gene ablation. *Curr Opin Immunol* 8, 394-401
- Mann K (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 82, 165-174
- Mannucci PM, Giangrande PLF (2000). Choice of replacement therapy for hemophilia: recombinant products only? *Hematol J* 1, 72-76
- Mannucci PM, Tuddenham EG (2001). The hemophilias – from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 344, 1773-1779
- Mariani G, Ghirardini A, Bellocco R (1994). Immune tolerance in hemophilia – Principal results from the international registry. Report of factor VIII and IX subcommittee. *Thromb Haemost* 72, 155-158
- Mason D (1998) A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 19, 395-404
- McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW, Hedner U, Ezban M (1995). Locations of disulfide bonds and free cysteines in the heavy and light chains of recombinant human factor FVIII (antihemophilic factor A). *Prot Sci* 4, 740-746
- Michnick DA, Pittman DD, Kaufman RJ (1994). Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem* 269, 20098-21102

- Migeon BR, McGinnis MJ, Antonarakis SE, Axelman J, Stasiowski BA, Youssoufian H, Kearns WG, Chung A, Pearson PL, Kazazian HH Jr, Muneer RS (1993). Severe hemophilia A in a female by cryptic translocation: order and orientation of factor VIII within Xq28. *Genomics* 16, 20-25
- Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T (1993). The IL-2 receptor complex: 1st structure, function and target genes. *Annu Rev Immunol* 11, 245-267
- Moiola L, Karachunski P, Protti M, Howard J, Conti-Tronconi BM (1994). Epitopes on the β subunit of muscle acetylcholine receptor recognized by CD4⁺ cells of myasthenia patients and healthy subjects. *J Clin Invest* 93, 1020-1028
- Mondorf W, Luban N, Meade J (1995). Anti-Faktor VIII-Antikörper bei Patienten mit Hämophilie A, die zum ersten Mal mit Faktor VIII-Konzentrat behandelt wurden. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* 26 Heft 6, 261-271
- Montoya MC, Sancho D, Vicente-Mazaneres M, Sanchez-Madrid F (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82
- Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, Saenko E, Kaveri SV, D'Oiron R, Sultan Y, Scandella D, Kazatchkine MD (2000). Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood* 95, 3435-3441
- Morel-Kopp MC, Tchernia G, Lambert T, Verdy E, Schlegel N, Dreyfus M, Chateauvieux L, Kaplan C (1992). AutoAb directed against the plated GP complex Ib-IX in normal individuals. *Blood* 80, 49a
- Morrison LA, Lukacher AE, Braciale VL, Fan DP, Braciale TJ (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med* 163, 903-921
- Mosesson MW, Fass DN, Lollar P, DiOrio JP, Parker CG, Knutson GJ, Hainfeld JF, Wall JS (1990). Structural model of porcine factor VIII and factor VIIIa molecules based on scanning transmission electron microscope (STEM) images and STEM mass analysis. *J Clin Invest* 85, 1983-1990
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL (1986). Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357
- Mosmann TR, Coffman RL (1989). Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46, 111-147
- Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 7, 138-146
- Moussalli M, Pipe SW, Hauri HP, Nichols WC, Ginsburg D, Kaufman RJ (1999). Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem* 274, 32539-32542
- Murphy KM (1998). T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* 10, 226-232
- Newton-Nash DK, Gill JC, Foster PA (1995). Cellular immune response to coagulant factor VIII in F.VIII inhibitor patients. *Adv Exp Med Biol* 386, 285

- Nathwani AC, Tuddenham EGD (1992). Epidemiology of coagulation disorders. *Bailliere's Clin Haematol* 5, 383-439
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999). The IL-4 receptor: signalling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17, 701-738
- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Moussalli MJ, Hauri HP, Ciavarella N, Kaufman RJ, Ginsburg D (1998). Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* 93, 61-70
- Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O (1988). Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* 318, 947-950
- Nilsson IM, Berntorp E, Zettervall O, Dahlback B (1990). Noncoagulation inhibitory factor VIII antibodies after induction of tolerance to factor VIII in Hemophilia A patients. *Blood* 75, 378-383
- O'Brien DP, Johnson D, Byfield P, Tuddenham EG (1992). Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry* 31, 2805-2812
- Oldenburg J, Schwaab R, Grimm T, Zerres K, Hakenberg P, Brackmann HH, Olek K (1993). Direct and indirect estimation of the sex ratio of mutation frequencies in hemophilia A. *Am J Hum Gen* 53, 1229-1238
- Oldenburg J, Picard JK, Brackmann HH, Tuddenham EGD, Simpson E (1997). HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to Intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost* 77, 238-242
- Oldenburg J, Brackmann HH, Hanfland P, Schwaab R (2000). Molecular genetics in haemophilia A. *Vox Sang* 78 (Suppl 2), 33-38
- Oldenburg J (2001). Mutation profiling in haemophilia A. *Thromb Haemost* 85, 577-579
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M (2003). Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 111, 1185-1199
- Ota K, Matusi M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183-187
- Palmer DS, Dudani AK, Drouin J, Ganz PR (1997). Identification of novel factor VIII inhibitor epitopes using synthetic peptides arrays. *Vox Sang* 72, 148-161
- Parker DC (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360
- Patarca R, Wei FY, Iregui MV, Cantor H (1991). Differential induction of interferon gamma gene expression after activation of CD4+ T cells by conventional antigen and Mls superantigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2736-2739
- Paul WE (1990). Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77, 1859-1870

- Peerlinck K, Arnout J, Di Giambattista, Gilles JG, Laub R, Jacquemin M, Saint-Remy JM, Vermynen J (1997). Factor VIII inhibitors in previously treated Haemophilia A patients with a double virus-inactivated plasma derived factor VIII concentrate. *Thromb Haemost* 77, 80-86
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G (1997). A molecular model for the triplicated A Domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* 8, 2413-2421
- Perham P, Adams EJ, Arnett KL (1995). The origins of HLA-ABC polymorphism. *Immunol Rev* 143, 141-180
- Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Eppelen JT, Kappos L, Wekerle H (1990). Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: Recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple sclerosis patients and healthy donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7968-7972
- Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ (1998). Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 273, 8537-8544
- Pittman DD, Wang JH, Kaufman RJ (1992). Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* 31, 3315-3325
- Pool JG, Hershgold EJ, and Pappenhagen AR (1964). High-potency antihemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate (letter). *Nature* 203, p312
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL (1999). Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* 402, 439-442
- Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH Jr, Hoyer LW (1999). Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost* 81, 240-244
- Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW (2000). Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia. *Blood* 95, 1324-1329
- Rammensee HG (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7, 85-96
- Raut S, Di Giambattista M, Bevan SA, Hubbard AR, Barrowcliffe TW, Laub R (1998). Modification of factor VIII in therapeutic concentrates after virus inactivation by solvent-detergent and pasteurisation. *Thromb Haemost* 80, 624-631
- Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Key NS, Conti-Fine BM (1999). CD4⁺ T cell response to factor VIII in haemophilia A, acquired haemophilia, and healthy subjects. *Thromb Haemost* 82, 509-515
- Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Christie BA, Key NS, Conti-Fine BM (2000). Sensitization of CD4⁺ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb Haemost* 84(4), 643-652
- Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Key NS, Conti-Fine BM (2001). CD4⁺ T cells specific for factor VIII as a target for specific suppression of inhibitor production. *Adv Exp Med Biol* 489, 119-134

- Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM (2002). Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost* 88(4), 568-575
- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM (2003). Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* 1(8), 1777-1784
- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM (2004). Epitope repertoire of human CD4(+) T cells on the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* 2(8), 1385-1394
- Reding MT (2006). Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia* 12 Suppl 6, 30-35
- Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J (2001). Applications of peptide array prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotech* 12, 59-64
- Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP (2000a). Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb Haemost* 84, 826-832
- Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP (2000b). FVIII neutralizing antibodies in murine hemophilia A as a model for immunotherapeutic intervention studies. *FASEB J* 14, A1130
- Reth M (1995). The B-cell antigen receptor complex and co-receptors. *Immunol Today* 16, 310-313
- Roberts HR (1999). The use of agents that by-pass factor VIII inhibitors in patients with haemophilia. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 38-41
- Rock KL, Goldberg AL (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-779
- Romagnani S (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18, 263-266
- Rosendaal FR, Smit C and Briet E (1991). Hemophilia treatment in historical perspective: a review of medical and social developments. *Ann of Hematol* 62, 5-15
- Rosenthal AS, Shevach EM (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. *J Exp Med* 138, 1194-1212
- Rosendaal FR, Smit C, Briet E. (1991). Hemophilia treatment in historical perspective: a review of medical and social developments. *Ann Hematol* 62, 5-15
- Rossi D, Zlotnik A (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242
- Rossi G, Sarkar J, Scandella D (2001). Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood* 97, 2750-2757
- Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, Horst J, Morris MA, Schaid DJ, de Moerloose P, Sommer SS, Kazazian HH, Antonarakis SE (1994). Factor VIII gene inversions causing severe haemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet* 3, 1035-1039

- Rotblat F, O'Brien DP, O'Brien FJ (1985). Purification of human factor VIII:C and its characterization by Western blotting using monoclonal antibodies. *Biochemistry* 24, 4294-4300
- Roth WK, Seifried E (2002). The German experience with NAT. *Transfusion Med* 12, 255-258
- Rudensky AYu, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353 (6345), 622-627
- Saenko EL, Shima M, Gilbert G et al. (1996). Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem* 271, 27424-27431
- Saenko EL, Scandella D (1997). The acidic region of the light chain and the C2 domain together form a high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem* 272, 18007-18014
- Saenko EL, Ananyeva N, Kouivskaia D, Schwinn H, Josic D, Shima M, Hauser CAE, Pipe S (2002). Molecular defects in coagulation factor VIII and their impact on FVIII function. *Vox Sang* 83, 89-96
- Sasgary M, Ahmad RU, Schwarz HP, Turecek PL, Reipert BM (2002). Single Cell Analysis of FVIII-specific T Cells in Hemophilic Mice after Treatment with Human Factor VIII. *Thromb Haemost* 87, 266-272
- Scandella D (1996). Human Anti-Factor VIII Antibodies: Epitope Localization and Inhibitory Function. *VoxSang* 70, 9-14
- Scandella D (1999). Epitope specificity and inactivation mechanisms of factor VIII inhibitor antibodies. *Vox Sang* 77 (Suppl 1), 17-20
- Scandella DH (2000). Properties of anti-factor VIII inhibitor antibodies in hemophilia A patients. *Semin Thromb Hemost* 26(2), 137-142
- Scandella D (2002). New characteristics of anti-factor VIII inhibitor antibody epitopes and unusual immune responses to Factor VIII. *Semin Thromb Hemost* 28, 291-296
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J (1995). Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 74, 1402-1406
- Schwarz HP (1996). Hemmkörperbildung bei Verabreichung von Gerinnungsfaktorpräparaten. *Ellipse* 12, 44-48
- Shaw G, Kamen R (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667
- Shearer GM (1974). CII mediated cytotoxicity to trinitrophenyl-modified syngenic lymphocytes. *Eur J Immunol* 4, 527-533
- Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Kamisue S, Terada S, Fukui H (1993). A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb Haemost* 69, 240-246
- Shima M (2006). Characterization of factor VIII inhibitors. *Int J Hematol* 83(2), 109-118

- Shtrichman R, Samuel CE (2001). The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* 4 (3), 251-259
- Siemasko K, Clark MR (2001). The control and facilitation of MHC class II antigen processing by the BCR. *Curr Opin Immunol* 13, 32-36
- Sim GK, Yague J, Nelson J, Marrack P, Palmer E, Augustin A, Kappler J (1984). Primary structures of human t-cell receptor alpha-chain. *Nature* 312, 771-775
- Singer ST, Addiego JE, Reason DC, Lucas AH (1996). T lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors. *Thromb Haemost* 76 (1), 17-22
- Soucie JM, Nuss R, Evatt B, Abdelhak A, Cowan L, Hill H, Kolakoski M, Wilber N, and the Hemophilia Surveillance System Project Investigators (2000). Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. *Blood* 96, 437-442
- Srivastava A (1998). Delivery of haemophilia care in the developing world. *Haemophilia* 4 (Suppl 2), 33-40
- Srivastava A (1999). Factor replacement for haemophilia – should cryoprecipitate be used? *Haemophilia* 5, 301-305
- Stavnezer J (1996). Immunoglobulin class switching. *Curr Opin immunol* 8, 199-205
- Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265, 106-109
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES (1988). Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334, 255-258
- Sugihara T, Takahashi I, Kojima T, Okamoto Y, Yamamoto K, Kamiya T, Matsushita T, Saito H (2000). Identification of plasma antibody epitopes and gene abnormalities in Japanese hemophilia A patients with factor VIII inhibitor. *Nagoya J Med Sci.* 63 (1-2), 25-39
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune response. *Annu Rev Immunol* 21, 713-758
- Tagliavacca L, Moon N, Dunham WR, Kaufman RJ (1997). Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 272, 27428-27434
- Teitel JM (2000). Viral safety of haemophilia treatment products. *Ann Med* 32, 485-492
- Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E (2001). Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 10(4), 535-44
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, Amphlett GW, Foster WB, Coe ML, Knutson GJ, Fass DN, Hewick RM (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature* 312, 342-347

- Tuddenham EG, Lane RS, Rotblat F, Johnson AJ, Snape TJ, Middleton S, Kernoff PB (1982). Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *Br J Haematol* 52, 259-267
- Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A (1999). Dynamic interactions of macrophages with T cell during antigen presentation. *J Exp Med* 190, 1909-1914
- Vanden Driessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I, Zwinnen H, Vanderhaeghen ML, Collen D, Chuah MKL (1999). Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in FVIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10379-10384
- Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EGD, Lawn RM, Capon DJ (1984). Structure of human factor VIII. *Nature* 312, 337-342
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E (1995). The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 73, 247-251
- Vermeylen J (1993). Factor VIII preparations: need for prospective pharmacovigilance. *Lancet* 342
- Villar A, Jimenez-Yuste V, Quintana M, Hernandez-Navarro F (2002). The use of haemostatic drugs in haemophilia: desmopressin and antifibrinolytic agents. *Haemophilia* 8, 189-193
- Villiers MB, Perrin-Cocon L, Marche PN, Villiers CL (2004). Complement receptors and B lymphocytes. *Crit Rev Immunol* 24, 465-478
- Walker FJ, Chavin SI, Fay PJ (1987). Inactivation of FVIII by activated protein C and protein S. *Arch Biochem Biophys* 252, 322-328
- Wang J, Reinherz EL (2001). Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 38, 1039-1049
- Weigle WO, Romball CG (1997). CD4⁺ T cell subsets and cytokines involved in peripheral tolerance. *Immunol Today* 18, 533-538
- Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW (1977). Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 60, 390-404
- Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM (1985). Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature* 317, 726-729
- Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ (1991). The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 266, 21948-21955
- Wood WI, Capon DJ, Simonsen CG, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, Delwart E, Tuddenham EGD, Vehar GA, Lawn RM (1984). Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312, 330-337

- Woods A, Chen HY, Trumbauer ME, Sirotina A, Cummings R, Zaller DM (1994). Human major histocompatibility complex class II-restricted T cell responses in transgenic mice. *J Expt Med* 180, 173-181
- Woodland DL, Dutton RW (2003). Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 15, 336-342
- World Federation of Hemophilia (2005). How serious is hemophilia? <http://www.wfh.org/index.asp?lang=EN>
- Wu H, Reding M, Qian J, Okita DK, Parker E, Lollar P, Hoyer LW, Conti-Fine BM (2001). Mechanism of the immune response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost* 85, 125-133
- Yangi Y, Yoshikai Y, Leggett K, Clark SP, Aleksander I, Mak TW (1984). A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308, 145-149
- Yee TT, Williams MD, Hill FGH, Lee CA, Pasi KJ (1997). Absence of inhibitors in previously untreated patients with severe haemophilia A after exposure to a single intermediate purity factor VIII product. *Thromb Haemost* 78, 1027-1029
- Yip HC, Karulin AY, Tary-Lehmann M, Hesse MD, Radeke H, Heeger PS, Trezza RP, Heinzel FP, Forsthuber T, Lehmann PV (1999). Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response. *J Immunol* 162 (7), 3942-3949
- York IA, Rock KL (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14, 369-96
- Zamoyska R (1998). CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune response? *Curr Opin Immunol* 10, 82-87
- Zelechowska MG, van Mourik JA, Brodniewicz-Proba T (1985). Ultrastructural localization of factor VIII procoagulant antigen in liver hepatocytes. *Nature* 317, 729
- Zhang W, Samelson LE (2000). The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Sem Immunol* 12, 35-41
- Zhang XY, Liu XG, Wang W, Wang WC, Gao XM (2003). Anti-T-cell humoral and cellular responses in healthy BALB/c mice following immunization with Ovalbumin or Ovalbumin-specific T cells. *Immunology* 108, 465-473
- Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D (1998) Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* 92, No. 1, 136-142
- Zinkernagel RM, Doherty PC (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547-548
- Zinkernagel RM, Hengartner H (2001). Regulation of the immune response by antigen. *Science* 293, 251-53

6 Zusammenfassung

Die Hämophilie A stellt die häufigste angeborene Koagulopathie dar. Ursache der Hämophilie A ist die fehlende oder verminderte Aktivität des Faktor VIII (FVIII)-Proteins, das eine zentrale Rolle im plasmatischen Gerinnungssystem spielt. Antikörper (Inhibitoren) vermittelte Reaktionen, die die Funktion des Gerinnungsfaktors VIII inhibieren können, stellen eine ernstzunehmende Komplikation bei der Substitutionstherapie von Hämophilie A-Patienten dar. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die komplexen immunologischen Mechanismen einer Inhibitorbildung auf Ebene der T-Helferzellen im hämophilen Mausmodell genauer zu untersuchen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob sich immunogene T-Zellepitope des humanen FVIII-Proteins identifizieren lassen, die für die Ausbildung einer T-Helferzellantwort und damit letztlich für eine Antikörperbildung gegen FVIII verantwortlich sein könnten. Hierzu wurden FVIII-KO-Mäuse intraperitoneal und intravenös mit FVIII-Protein immunisiert und die T-Zellantwort isolierter Milz-T-Helferzellen gegen FVIII-Gesamtprotein sowie ein Panel aus 240 synthetisch hergestellten 15mer Peptiden immunogener Regionen (a1: AS 320-405, A2: AS 460-595, a3: AS 1630-1715, A3: AS 1790-1845, C1-C2: AS 1977-2332) des FVIII-Proteins untersucht. Es zeigte sich, dass FVIII-KO-Mäuse unter den genannten Bedingungen vorrangig eine T_H1 -Antwort (IFN- γ) ausprägen. Die Frequenz FVIII-spezifischer T-Helferzellen liegt hierbei im Mittel bei 44 FVIII-spezifischen $CD4^+$ -Zellen/ 10^5 T-Helferzellen. Eine weitere Steigerung der zur Restimulation eingesetzten FVIII-Dosis auf $10\mu\text{g/ml}$ führte interessanterweise zu einer Abschwächung der T-Zellantwort (11 $CD4^+$ -Zellen/ 10^5 T-Helferzellen). Die Untersuchung der Spezifität der T-Zellantwort durch Restimulation mit FVIII-Peptidpools der einzelnen Regionen des FVIII-Proteins ergab zunächst eine vergleichbar starke T-Zellantwort gegen alle eingesetzten FVIII-Peptidpools (24 FVIII-spezifische $CD4^+$ -Zellen/ 10^5 T-Helferzellen). Eine weiterführende Auflösung der Peptidpools mit anschließender Untersuchung der T-Zellspezifität gegen die einzelnen 240 FVIII-Peptide ergab, dass die T-Helferzellen immunisierter FVIII-KO-Mäuse gegen alle Peptide gleichermaßen reagierten (Frequenz von im Mittel 47 FVIII-spezifische $CD4^+$ -Zellen/ 10^5 $CD4^+$ -T-Zellen), nicht aber gegen ein mitgeführtes irrelevantes Kontrollantigen Ova₃₂₃₋₃₃₉. Hämophile Mäuse, die mit humanem FVIII-Protein immunisiert wurden, scheinen demnach eine T-Zellantwort auszubilden, wie sie der von gesunden Probanden entspricht, bei denen ebenfalls T-Zellen gegen eine Vielzahl verschiedener FVIII-Peptide nachgewiesen werden konnten (Reding et al., 2004). Diese klinisch irrelevanten T-Zellklone werden im Rahmen der Ausbildung einer spezifisch gegen FVIII gerichteten T-Zellantwort bei Hämophilie A-Patienten möglicherweise herunterreguliert, so dass T-Zellklone gegen individuelle klinisch relevante Epitope prädominieren (Reding et al., 2004).

6 Summary

Haemophilia A is the most common congenital coagulopathy caused by deficiency or reduced activity of the factor VIII (FVIII) protein, which plays a central role in the plasma coagulation system. Antibody-(inhibitor) mediated reactions can inhibit the function of clotting FVIII and are a serious complication in the substitution therapy of haemophilia patients. The aim of this study was to specify the complex immunologic mechanisms of inhibitor formation on T helper cell level in a haemophilic mouse model.

In particular it should be examined whether the immunologic T cell epitopes are identified for the formation of a T cell response and are therefore responsible for antibody synthesis against FVIII. To test this, FVIII knock out mice were immunized intraperitoneally and intravenously with FVIII protein and the T cell answer of isolated spleen T helper cells against the complete FVIII protein and a panel of 240 synthetically produced, overlapping FVIII-15mer peptides of immunologic regions (a1: AS 320-405, A2: AS 460-595, a3: AS 1630-1715, A3: AS 1790-1845, C1-C2: AS 1977-2332) was analysed. Under these conditions, it was shown that FVIII knock out mice preferential developed a TH1 response (IFN-gamma). The frequency of FVIII specific T helper cells was in average 44 FVIII specific CD4⁺ cells per 100.000 T helper cells. Interestingly, further restimulation with higher FVIII concentrations up to 10 µg/ml FVIII down-regulated the T cell response to 11 specific CD4⁺ cells per 100.000 T helper cells. The analysis of T cell response specificity by restimulation with FVIII peptide pools of single regions of the FVIII protein showed initially a comparable vigorous T cell response against all tested FVIII peptide pools (24 FVIII specific CD4⁺ cells per 100.000 T helper cells). A further release of peptide pools with following analysis of T cell specificity against the 240 single FVIII peptides showed that T helper cells of immunized FVIII knock out mice reacted against all peptides in the same manner (frequency with an average of 47 FVIII specific CD4⁺ T cells per 100.000 CD⁺ T cells) but not against an immunologically irrelevant, control antigen (Ova₃₂₃₋₃₃₉).

Human FVIII protein immunized haemophilia mice develop a T cell response comparable to healthy subjects. In healthy subjects, T cells against a range of several FVIII peptides were also detected. In haemophilia A patients, these clinically irrelevant T cell clones are possibly down-regulated in context of formation of a specific T cell response against FVIII, with predominance of T cell clones against individual clinically relevant epitopes.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHF	Anti-hämophiler-Faktor
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure(n)
BD	Becton Dickinson
bp	Basenpaare
BSD	Blutspendedienst
BU	Bethesda Einheit
CD	„cluster of differentiation“
CD40L	CD40-Ligand
Da	Dalton
DDAVP	Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin)
dH ₂ O	Wasser (reinst)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-17	Knockout des Exons 17 im FVIII-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Intermediäres Kompartiment
Facs	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	fötales Rinderserum
FSC	„forward scatter“
FIX	Faktor IX
FIXa	Faktor IX (aktiviert)
FVIIa	Faktor VII (aktiviert)
FVIII	Faktor VIII
FVIIIa	Faktor VIII (aktiviert)
FVIII:Ag	FVIII-Antigen
FVIII:C	FVIII-Aktivität
FIX	Faktor IX
FX	Faktor X
FXa	Faktor X (aktiviert)
GM-CFS	„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	„horse radish peroxidase“
IFA	„incomplete“ Freund's Adjuvant
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intra peritoneal
ITT	Immun-Toleranz-Therapie
IU	internationale Einheit(en)
i.v.	intra venös
kb	Kilobasenpaare
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KO	„knockout“

MACS	magnetische Zellseparation (magnetic activated cell separation)
MHC	“major histocompatibility complex”
mRNA	“messenger RNA”
NO	Stickstoffoxid
OVA	Ovalbumin
PBS	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pdFVIII	“plasma derived”-Gerinnungsfaktor VIII
PE-konjugiert	Phycoerythrin-konjugiert
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rFVIII	„recombinant“-Gerinnungsfaktor VIII
rhFVIII	„recombinant human“-Gerinnungsfaktor VIII
RT	Raumtemperatur
SCID	schwere komplexe Immundefizienz
SD	„solvent detergent“
SI	Stimulationsindex
SSC	“side scatter”
Tab.	Tabelle
TCR	„T-cell-receptor“
TGF- β 1	„transforming growth factor“- β 1
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptoren
vWF	von Willebrand-Faktor

Danksagung

Für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie / DKR-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen in Frankfurt am Main danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Erhard Seifried.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Torsten Tonn für die sehr intensive fachliche und persönliche Betreuung der Arbeit, seine wertvollen Anregungen bei der Auswertung sowie der Diskussion der Daten und das dadurch erweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten. Die fruchtbaren Gespräche trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Genauso gilt mein Dank der mit großem Einsatz erfolgten freundschaftlichen Unterstützung meiner Laborarbeit durch Nadine Sorg und den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des DKR-Blutspendedienstes.

Der Firma Biotest GmbH in Dreieich, insbesondere Herrn Dr. Mathias Berhmann danke ich für die gute Kooperation, die fachliche Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft Herrn Prof. Dr. Heinfried Radeke am Institut für klinische Pharmakologie der Universität Frankfurt am Main danke ich für vielerlei fachlichen und technischen Rat bei der Etablierung des Elispot-Assays, Herrn Jörg Muscheid für die Durchsicht des Manuskripts.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten sowie meinen Freunden, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegengebracht haben.

Anais und Tine danke ich, dass sie mich in der vergangenen Zeit immer tatkräftig unterstützt haben und mir ermöglichten, in dieser entscheidenden Lebensphase mich auf diese Arbeit zu konzentrieren.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

"Untersuchung der Antigenpezifität der T-Zellantwort gegen substituiertes FVIII-Protein in Gerinnungsfaktor VIII E-17-KO-Mäusen"

im DRK - Blutspendedienst Baden Württemberg - Hessen, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Erhard Seifried und Unterstützung von Herrn PD Dr. T. Tonn ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort und Datum) (Unterschrift)