

# Die Variabilität des Ratten iNKT TCR

## The variability of the rat iNKT TCR

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Graduate  
School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von  
Daniel Sylvester Paletta  
aus  
Augsburg

Würzburg 2015

Eingereicht am: .....

(Bürostempel)

**Mitglieder des *Promotionskomitees*:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Herrmann

2. Betreuer Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	T Zellpopulationen . . . . .	2
1.2	CD1 Familie . . . . .	3
1.2.1	CD1d Antigenpräsentation . . . . .	4
1.3	iNKT Zellen . . . . .	5
1.3.1	Entwicklung von iNKT Zellen . . . . .	5
1.3.2	Funktion von iNKT Zellen . . . . .	7
1.3.3	Interaktionen des iNKT TCR . . . . .	8
1.3.4	iNKT Zellen der Ratte . . . . .	10
1.4	Ziel dieser Arbeit . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Materialien . . . . .	12
2.1.1	Tiere . . . . .	12
2.1.2	Zelllinien . . . . .	12
2.1.3	Reagenzien . . . . .	13
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen . . . . .	15
2.1.5	Vektoren . . . . .	20
2.1.6	Oligonukleotide . . . . .	22
2.1.7	Antikörper und Oligomere . . . . .	23
2.1.8	Kits . . . . .	24
2.1.9	Geräte . . . . .	25
2.1.10	Verbrauchsmaterial . . . . .	26
2.1.11	Computersoftware und Internetadressen . . . . .	27

2.2	Methoden . . . . .	29
2.2.1	Mikro- und Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.2.1.1	Restriktionsverdau und Ligation von Insert und Vektoren . . . . .	29
2.2.1.2	Gelelektrophorese und DNA Extraktion aus Agarosegelen . . . . .	29
2.2.1.3	Transformation von Bakterien . . . . .	29
2.2.1.4	DNA Mini- und Midipräparation zur Isolierung von Plasmiden . . . . .	29
2.2.1.5	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	30
2.2.1.6	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren . . . . .	30
2.2.1.7	cDNA Synthese . . . . .	31
2.2.1.8	Sequenzierung von DNA . . . . .	31
2.2.1.9	Ortsspezifische Mutagenese von TCR $\alpha$ Ketten . . . . .	32
2.2.1.10	Klonierung des humanen CD1d in pXIg . . . . .	33
2.2.1.11	Klonierung des humanen iNKT TCR . . . . .	34
2.2.1.12	Klonierung der <i>rBV8S2</i> $\beta$ Kette . . . . .	34
2.2.1.13	Austausch des CDR3 $\beta$ Segments . . . . .	34
2.2.1.14	Analyse von <i>rAV14</i> TCR $\alpha$ Ketten . . . . .	35
2.2.1.15	Analyse der TCR $\beta$ Kette . . . . .	35
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	35
2.2.2.1	SDS-PAGE . . . . .	35
2.2.2.2	Maus IL-2 ELISA . . . . .	37
2.2.2.3	Maus IgG <sub>1</sub> ELISA . . . . .	37
2.2.2.4	CD1d ELISA . . . . .	37
2.2.2.5	Produktion von CD1d Dimeren . . . . .	37
2.2.2.6	Beladung von CD1d Dimeren . . . . .	38
2.2.2.7	Beschichtung von pan mIgG Dynabeads <sup>®</sup> . . . . .	38
2.2.3	Zellbiologische Methoden . . . . .	39
2.2.3.1	Zellkultur . . . . .	39
2.2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	39
2.2.3.3	Transfektion von JJ58L . . . . .	39
2.2.3.4	Retrovirale Transduktion . . . . .	39
2.2.3.5	Stimulation von Transduktanten . . . . .	40
2.2.3.6	Stimulation expandierter Ratten iNKT Zellen . . . . .	41

2.2.3.7	Präparation von Thymocyten . . . . .	41
2.2.3.8	Präparation von Milzzellen . . . . .	41
2.2.3.9	Präparation von Intrahepatischen Lymphocyten . . . . .	41
2.2.3.10	Expansion von iNKT Zellen . . . . .	42
2.2.3.11	Langzeitkultur isolierter iNKT Zellen . . . . .	42
2.2.3.12	Fusion von expandierten F344 Milzzellen . . . . .	43
2.2.3.13	Durchflusszytometrische Analyse von Zellen . . . . .	43
2.2.3.14	Statistische Analyse von Daten . . . . .	44
2.2.3.15	Molekulare Modellierungen . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	CD1d Dimere als Hilfsmittel zur Untersuchung von iNKT Zellen . . . . .	45
3.1.1	Generierung humaner CD1d Dimere . . . . .	45
3.1.2	Vergleich von Beladungsbedingungen . . . . .	47
3.2	<i>In vitro</i> CD1d Dimerbindungsstudien . . . . .	53
3.2.1	Untersuchung des CDR2 $\alpha$ und HV4 $\alpha$ . . . . .	55
3.2.2	Untersuchung des V-J Übergangs . . . . .	58
3.2.3	Untersuchung der $\beta$ Kette . . . . .	62
3.3	TCR Expression in Ratten iNKT Zellen . . . . .	64
3.3.1	Expansion von Ratten iNKT Zellen . . . . .	64
3.3.2	<i>AV14</i> Expression in F344 iNKT Zellen . . . . .	66
3.3.3	<i>BV</i> Expression in F344 iNKT Zellen . . . . .	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1	Beladung von CD1d Dimeren . . . . .	75
4.2	CD1d Dimerbindungsstudien . . . . .	80
4.3	TCR Expression von Ratten iNKT Zellen . . . . .	88
4.4	Ausblick . . . . .	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>98</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>101</b>

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>127</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>128</b>
<b>Danksagung</b>	<b>131</b>

# 1 Einleitung

Spricht man von Immunität, meint man im Allgemeinen die Unempfindlichkeit gegenüber einer Sache oder einem Vorgang. So bezieht sich in der Medizin Immunität auf die Unempfindlichkeit eines Organismus gegenüber Schädlichem, wie Pathogenen, Tumoren oder Giften. Teil der Aufgaben des Immunsystems ist es hierbei, Fremdes von Eigenem zu unterscheiden und anzugreifen, wodurch eben jene Immunität hergestellt werden kann. Die eigentliche Herausforderung höherer Organismen ist jedoch vielmehr ein fragiles Gleichgewicht innerhalb eines sensiblen Systems zu schaffen und aufrecht zu erhalten. Dem wird durch ein komplexes Zusammenspiel der vielfältigen Komponenten des Immunsystems zu begegnen versucht. Vereinfacht können jene Komponenten in zwei Bereiche eingeteilt werden: Die natürliche Immunität und die adaptive (erworbene) Immunität. Beide unterscheiden sich anhand Geschwindigkeit, Spezifität und Gedächtnis. Während die natürliche Immunantwort unspezifisch ist und unmittelbar bei Kontakt mit beliebigen Erregern ausgelöst werden kann, zeigt die adaptive Immunantwort eine gewisse Latenz. Sie ist jedoch mit hoher Spezifität jedem Erreger angepasst und steigert ihre Effizienz durch Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses, was sich bei Zweitkontakt in einer deutlich schnelleren und gesteigerten Immunantwort auswirkt. Diese Unterschiede beruhen auf der Art der exprimierten Rezeptoren: Keimbahncodierte und begrenzt vielfältige Rezeptoren der Effektorzellen des natürlichen Immunsystems auf der einen, sowie die hohe Vielfalt durch somatische Rekombination generierter Rezeptorspezifitäten des adaptiven Immunsystems auf der anderen Seite.

Alle Zellen des Immunsystems gehen auf pluripotente hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark zurück, aus denen sowohl lymphatische als auch myeloide Vorläuferzellen entstehen. Aus letzteren entwickeln sich Granulozyten wie Neutrophile, Eosinophile, Basophile, sowie die Mastzellen und Monozyten. Zudem stammen Megakaryozyten sowie Erythroblasten der myeloiden Linie ab. Aus lymphatischen Vorläufern entwickeln sich B Zellen, T Zellen und Natürliche

## 1 Einleitung

Killerzellen (NK Zellen). Somit entstammen die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems myeloiden Vorläuferzellen, wohingegen die klassischen Vertreter des adaptiven Immunsystems, B Zellen und T Zellen, aber auch NK Zellen sich aus lymphatischen Vorläufern entwickeln. Während B und T Zellen zur Erkennung körperfremder Bestandteile auf das gleiche Prinzip der Rezeptorgenerierung zurückgreifen, unterscheidet sich ihre Rolle in der adaptiven Immunantwort stark. B Zellen nutzen hierbei den Rezeptor selbst, indem dieser nicht nur zur spezifischen Erkennung von Antigenen, sondern in löslicher Form als Antikörper auch zur deren Klärung aus dem System eingesetzt wird. Diese Art der Bekämpfung frei im Körper befindlicher Antigene wird auch als humorale Immunantwort bezeichnet. T Zellen wiederum sind größtenteils für die zelluläre Immunantwort verantwortlich, deren Aufgabe die Erkennung und Entfernung veränderter körpereigener Zellen ist.

### 1.1 T Zellpopulationen

T Zellen spielen eine wichtige Rolle im Verlauf der adaptiven Immunantwort. Sie tragen direkt zur zellulären Immunantwort bei, indem veränderte körpereigene Zellen erkannt und zerstört werden, und helfen bei der Regulation der Immunantwort. Sie bieten jedoch auch B Zellen in verschiedener Form Hilfe zur Generierung einer effektiven humoralen Immunantwort. Die Verwirklichung dieser unterschiedlichen Aufgaben wird durch eine Spezialisierung erreicht, die meist schon während der Entwicklung der T Zelle im Thymus festgelegt wird und stark von der zufällig generierten Rezeptorspezifität abhängt. Zur Einteilung der T Zellpopulation in ihre spezialisierten Untergruppen werden Unterscheidungsmerkmale wie T Zellrezeptor (TCR) und Oberflächenexpression von (Co)rezeptoren herangezogen. Die ‚klassische‘ T Zelle exprimiert einen TCR, bestehend aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Kette, CD8 oder CD4 Moleküle als Corezeptoren und bindet Oberflächenmoleküle wie den Peptid präsentierenden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse I oder II. Während MHC I restringierte  $CD8^+ \alpha\beta$  T Zellen sich meist als zytotoxische T Lymphozyten (CTL) der Zerstörung veränderter körpereigener Zellen widmen, setzt die klassische MHC II restringierte  $CD4^+ \alpha\beta$  T Zelle Cytokine frei, die als Signale zur Steuerung und Regulation des weiteren Verlaufs der adaptiven Immunantwort dienen.

Es gibt jedoch viele T Zellsubpopulationen, die nicht in dieses konventionelle Muster der T Killer- oder T Helferzelle fallen, oder auf anderem Weg zu ähnlicher Funktion gelangen. So kann

statt des  $\alpha\beta$  auch ein  $\gamma\delta$  TCR exprimiert werden, was mit starken Auswirkungen auf Ligandspezifitäten und die Spezialisierung dieser T Zellsubpopulationen einhergeht. Aber auch innerhalb der  $\alpha\beta$  T Zellpopulation existieren Abweichungen von der bekannten MHC:Peptid Restriktion. So sind sogenannte Mukosa assoziierte invariante T Zellen (MAIT) beschrieben, deren Ligand ein MR1 genanntes Oberflächenmolekül ist, welches mikrobielle Metabolite präsentiert [1, 2]. Zudem sind verschiedene Populationen von  $\alpha\beta$  T Zellen bekannt, deren Antigen von einer Familie von nicht polymorphen MHC Klasse I ähnlichen Oberflächenmolekülen präsentiert wird, die als CD1 bezeichnet werden [2–4]. Oft geht eine solche Abweichung von klassischen T Zellliganden mit einer Reduktion der TCR Diversität einher und man spricht von (semi-)invarianten T Zellen, die meist nicht nur in der Ligandenerkennung, sondern auch in Effektorfunktion und Gewebslokalisierung (Homing) hoch spezialisiert sind.

## 1.2 CD1 Familie

Moleküle der CD1 Familie gehören zu den Vertretern einer Gruppe von nicht klassischen *MHC* (*MHC Ib*) Genen, die im Gegensatz zu *MHC Ia* Genen (klassisches MHC I Molekül) nicht polymorph sind und phylogenetisch in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden können, aber ebenso antigenpräsentierende Vertreter aufweisen [5]. Diese unterscheiden sich oft grundlegend in der Art der Antigenpräsentation von klassischen MHC Molekülen, wie die Mitglieder der CD1 Familie, die Lipide anstatt Peptide präsentieren [6]. Diese besteht, eingeteilt nach Sequenzhomologien, aus den Untergruppen 1 (CD1a-c), 2 (CD1d) und 3 (CD1e) [7, 8]. Vertreter der CD1 Familie gehören zu den phylogenetisch ältesten MHC Klasse Ib Molekülen und dass keine Säugerspezies bekannt ist, bei der kein *CD1* Gen beschrieben wurde, deutet auf deren Bedeutung hin. Es bestehen jedoch Unterschiede in Anzahl und Vielfalt der in verschiedenen Säugerspezies vorhandenen Gene der CD1 Familie. So besitzt der Mensch Gene aller Vertreter der CD1 Familie, während Maus und Ratte ausschließlich *CD1D* Gene besitzen [9].

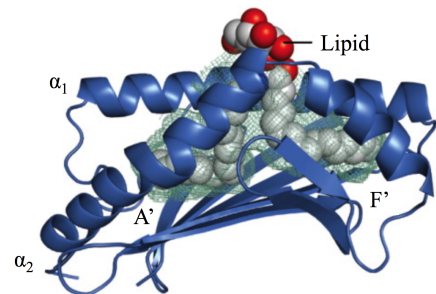
Alle CD1 Moleküle weisen strukturelle Gemeinsamkeiten mit MHC Klasse I Molekülen auf, sind jedoch nicht im MHC Locus codiert und nicht polymorph. Sie unterscheiden sich untereinander in Antigenbindungsfurche, Antigenpräsentation, Transkriptionsregulation, intrazellulärem Trafficking und Expression [8]. Im Besonderen soll nun auf die Eigenschaften von CD1d eingegangen werden, den am Besten beschriebenen Vertreter der CD1 Familie, das als antigenpräsentierendes Molekül einer Subpopulation der  $\alpha\beta$  T Zellen, den sogenannten Natürlichen

## 1 Einleitung

Killer T Zellen (NKT Zellen), dient [10, 11].

### 1.2.1 CD1d Antigenpräsentation

CD1d ähnelt strukturell dem MHC Klasse I Molekül. Es besitzt eine in drei Domänen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ) gefaltete und nicht-kovalent mit  $\beta_2$ Microglobulin assoziierte schwere Kette [13]. Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden dabei eine Antigenbindungsfurche, die zwei hydrophobe Taschen A' und F' besitzt und im Vergleich zu der des MHC Klasse I Moleküls enger und tiefer ausfällt. An die  $\alpha_3$  Domäne schließt sich eine transmembrane Region mit intrazellulärem Carboxyterminus an, der beim intrazellulärem



**Abbildung 1.1:** Struktur der CD1d Antigenbindungsfurche mit  $\alpha$ -Galactosylceramid als Ligand. Verändert nach [12].

Trafficking eine wichtige Rolle spielt [14]. Die nah zusammenliegenden, hydrophoben Bindungstaschen der CD1d Bindungsfurche ermöglichen das Einfügen hydrophober Ketten von Glycolipidantigenen. Diese reichen in die Bindungstaschen bis zum nach unten begrenzenden Bereich der  $\beta$ -Faltblattstruktur, so dass nur die polare Kopfgruppe des Antigens zwischen den die Bindungsfurche formenden  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Helices mittig herausragt (vgl. Abb. 1.1) [12].

Die Beladung von CD1d Molekülen mit Selbstlipiden findet nach cotranslationalem Import in das Endoplasmatische Reticulum mit Hilfe des Microsomalen Transferproteins MTP statt [14]. Nach Erreichen der Zelloberfläche per sekretorischem Weg über den Golgi Apparat werden CD1d Moleküle über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus wieder internalisiert, woraufhin es in späten endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten zum Austausch der gebundenen Antigene kommen kann. In diesen Bereichen der Zelle befinden sich exogene Antigene, die zuvor mittels verschiedener Mechanismen, wie Phagozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose über einen Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDLR), C-Typ Lektin oder Scavenger Rezeptoren, internalisiert wurden [14, 15]. Da von CD1d präsentierte Lipidantigene wasserunlöslich sind, spielen *in vivo* Lipid-Transfer Proteine (LTP) wie Saposine während der Neubeladung von CD1d eine entscheidende Rolle. Diese sind in der Lage, eine offene Konfiguration der hydrophoben CD1d Bindungstaschen zu stabilisieren und die ebenso hydrophoben Liganden zum Transfer aus Membranen zu mobilisieren und können, wie CD1e, den Austausch der gebundenen Lipidantigene vermitteln [2, 16]. Beeinflusst wird dieser Transfer auch von niedrigen pH Werten



(pH 4,5 - 5,5), die in in späten endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten vorherrschen und die Dislokation von Lipiden aus der CD1d Bindungsfurche begünstigen können [17].

## 1.3 iNKT Zellen

Der Name Invariante Natürliche Killer T Zelle (iNKT Zelle) leitet sich vom Aufbau des iNKT spezifischen semi-invarianten TCR und der für T Zellen untypischen Expression von NK Rezeptoren (NKR-P1C/NK1.1 in Mäusen) ab. Sie stellen eine der drei Untergruppen der NKT Zellen dar, die zum ersten Mal als  $CD3^+CD4^-CD8^-$  T Zellen der Maus entdeckt und später als  $NK1.1^+TCR^+$  T Zellpopulation beschrieben wurden [18, 19]. Tatsächlich jedoch exprimieren nicht alle iNKT Zellen neben ihrem TCR auch NK Rezeptoren. Wesentlich besser zu ihrer Identifizierung und Definition geeignet ist daher die CD1d abhängige  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ GC) Reaktivität von iNKT Zellen, die auf ihre T Zellrezeptorspezifität zurückzuführen ist und ein Alleinstellungsmerkmal darstellt [10, 11].  $\alpha$ GC, auch als KRN7000 bezeichnet, ist das synthetische Derivat eines ursprünglich aus dem marinen Schwamm *Agelas mauritanus* isolierten Stoffes: Es ist ein den Cerebrosiden zugehöriges Glycosphingolipid bestehend aus einer polaren Kopfgruppe, der Galactose, die über eine  $\alpha$ -anomerische Bindung mit einer Sphingosin- und einer Alkylkette verbunden ist (vgl. Abb. 1.2). Der Reaktivität und damit auch die Population der iNKT Zellen definierende iNKT TCR besteht aus einer invarianten  $\alpha$  Kette (uniforme *AV14/AJ18* Umlagerung bei Mäusen bzw. die homologe uniforme *AV24/AJ18* Umlagerung bei Menschen), die mit einer limitierten Auswahl an  $\beta$  Ketten (größtenteils BV8S2, BV7 oder BV2 bei Mäusen bzw. BV11 bei Menschen) gepaart sein kann [20–26].

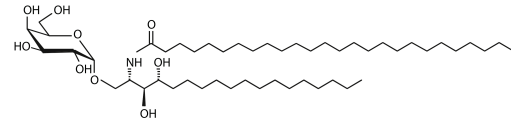
### 1.3.1 Entwicklung von iNKT Zellen

Die Entwicklung von iNKT Zellen verläuft wie bei ‚klassischen‘  $\alpha\beta$  T Zellen ausgehend von noch undifferenzierten Vorläuferzellen, die, aus dem Knochenmark stammend, den Thymus besiedeln. Diese besitzen das Potential, sich zu T, B und NK Zelllinien, aber auch zu myeloiden Zellen wie Dendritischen Zellen und Erythrozyten zu differenzieren [27]. Erst bei Eintritt in den Thymus verlieren die Vorläuferzellen ihre Fähigkeit, andere Zellen neben T Zellen auszubilden [28]. Im Thymus beginnt die Differenzierung der Vorläufer als  $CD4^-CD8^-$  Doppelnegative T Zelle (DN), bevor sie ein transientes Doppelpositives (DP) Stadium erreichen und nach erfolgter Selektion den Thymus verlassen. Entscheidend für die weitere Entwicklung ist die Selektion als

## 1 Einleitung

iNKT Zelle nach zufälliger Umlagerung des spezifischen iNKT TCR. Die Generierung der  $\alpha$  und  $\beta$  Kette des TCR während der Entwicklung von T Zellen geschieht durch somatische Rekombination. Die variable (V) Region des TCR wird durch die umgelagerten V (variable) und J (junctional) Gensegmente ( $\alpha$  Kette) bzw. V, D (diversity) und J Gensegmente ( $\beta$  Kette) gebildet. Diese Umlagerung ist enzymabhängig [29].

Die Bildung der  $\alpha$  Kette ist aufgrund der Distanz der umgelagerten *AV14* und *AJ18* Gensegmente unter anderem von dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t und dem antiapoptotischen Protein BCL-X<sub>L</sub> abhängig, die das Überleben während multipler



**Abbildung 1.2:** Struktur von  $\alpha$ -Galactosylceramid. [12]

Umlagerungen garantieren [30, 31]. Nach erfolgter zufälliger Umlagerung des TCR können iNKT Zellen im Gegensatz zu konventionellen T Zellen im Thymus durch die Bindung an CD1d:Selbstantigenkomplexe auf der Oberfläche anderer, dem Knochenmark entstammender Thymocyten im DP Stadium, selektioniert werden [32]. Als (selektionierende) Selbstantigene für iNKT Zellen wurden bisher aufgrund fehlender  $\alpha$ -Transferasen meist  $\beta$ -anomerische Glycolipide wie  $\beta$ -Glucosylceramid [33–35] oder strukturell ähnliche Lipide in Betracht gezogen [36–38]. Erst vor kurzem konnte jedoch die Produktion  $\alpha$ -anomerischer Glycolipide in Säugerzellen nachgewiesen und  $\alpha$ -Glycosylceramide als Hauptselbstantigen in Thymus und Peripherie identifiziert werden [39]. Das Signal zur positiven Selektion wird durch simultane Interaktion von TCR und Bindung von Oberflächenmolekülen der SLAM Familie generiert, was zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B Signalkaskade führt. Diese Abhängigkeit der positiven Selektion von SLAM Proteinen ist iNKT spezifisch und wird nicht zur Selektion MHC restringierter T Zellen genutzt [40–43]. Obwohl iNKT Zellen eine Population autoreaktiver Zellen sind, werden sie jedoch, ebenso wie konventionelle  $\alpha\beta$  T Zellen, bei zu hoher intrinsischer Affinität des umgelagerten T Zellrezeptors für den selektionierenden CD1d:Selbstantigenkomplex negativ selektioniert und somit das Level ihrer Autoreaktivität begrenzt [44–46]. Nach erfolgter Selektion der iNKT Zellen verlieren diese die CD8 Expression und gehen in ein Zwischenstadium über, während dessen eine massive Proliferation der iNKT Zellen und gleichzeitig der mögliche Verlust der CD4 Expression stattfindet [25]. DN und CD4<sup>+</sup> iNKT Zellen unterscheiden sich funktionell hinsichtlich der Cytokinsekretion [47]. Die Fähigkeit zur Produktion von Cytokinen wird bei beiden Subpopulationen gleichermaßen während der Entwicklung im Thymus erlangt [48, 49]. Ein Großteil der

iNKT Zellen verlässt schließlich den Thymus und erlangt ein reifes Stadium, das sich neben der Expression des spezifischen iNKT TCR meist auch durch Vorhandensein von NK Rezeptoren auszeichnet [25]. Nach Verlassen des Thymus migrieren iNKT Zellen vorwiegend in Leber sowie Milz, während sie im Gegensatz zu anderen  $\alpha\beta$  T Zellpopulationen kaum in Lymphknoten vorhanden sind [50, 51].

### 1.3.2 Funktion von iNKT Zellen

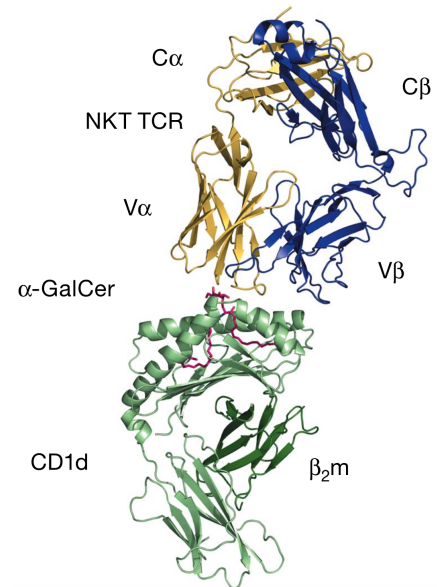
iNKT Zellen können nach erfolgreicher Selektion und Verlassen des Thymus, ähnlich wie Gedächtniszellen oder Zellen des natürlichen Immunsystems, bei Antigenkontakt unmittelbar Cytokine produzieren und in großer Menge freisetzen, während klassische  $\alpha\beta$  T Zelle den Thymus als sogenannte naive T Zellen verlassen, die zunächst nach Kontakt mit professionellen Antigenpräsentierende Zellen (APC) zu Effektor- oder Gedächtniszellen differenzieren müssen. Als Schlüssel zur Ausprägung dieses voraktivierten Phänotyps gilt wie bei  $\gamma\delta$  T Zellen sowie MAIT Zellen der zur BTB-ZF Familie zugehörige Transkriptionsfaktor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) [52, 53]. Dies ermöglicht iNKT Zellen schnell und gezielt ihre Effektorfunktion auszuüben, sowie die folgende Immunantwort zu lenken. iNKT Zellen können sowohl bei der Abwehr von Pathogenen, als auch bei der Überwachung körpereigener Zellen hinsichtlich Krebs und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielen [54]. Die Aktivierung von iNKT Zellen kann hierzu sowohl TCR abhängig, als auch unabhängig durch Cytokine wie IL-12, IL-2 oder IL-18 erfolgen [55–58]. Die direkte, TCR abhängige Aktivierung bei Bindung von CD1d:Antigenkomplexen kann durch Präsentation körperfremder Lipide erfolgen, jedoch auch durch, im Verlauf der Immunantwort hoch exprimierte, endogene Lipide [59, 60]. Wobei letzteres zusätzlich von der Stimulation durch inflammatorische Cytokine abhängt und auch als Mechanismus zur Abwehr von Pathogenen genutzt werden kann [35]. Charakteristisch für iNKT Zellen ist die Ausschüttung großer Mengen an IFN- $\gamma$  oder T<sub>h</sub>2 Cytokinen wie IL-4 oder IL-13. Darüber hinaus wurde jedoch auch eine IL-17 produzierende iNKT Subpopulation beschrieben [61]. Die Regulation der Produktion von T<sub>h</sub>1 gegenüber T<sub>h</sub>2 Cytokinen wird von der Art der Aktivierung beeinflusst. Verschiedene  $\alpha$ -GalCer Derivate erzeugen unterschiedliche iNKT Zellantworten, was Cytokinzusammensetzung und -menge betrifft. Dies kann in Unterschieden seitens der präsentierenden Zellen begründet sein, durch die die iNKT Zelle aktiviert wird [62], aber auch in einer abweichenden Interaktion des iNKT TCR während der Aktivierung [63]. Während der Stimulation von iNKT Zellen durch Dendritische Zellen findet außerdem ei-

## 1 Einleitung

ne CD40L abhängige reziproke Aktivierung statt, die zur weiteren Aktivierung und Reifung Dendritischer Zellen führt, wodurch die Immunantwort gesteigert werden kann [25, 64].

### 1.3.3 Interaktionen des iNKT TCR

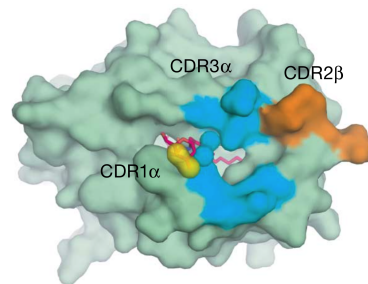
Die wichtigste Charakteristik von iNKT Zellen ist die Expression des semi-invarianten T Zellrezeptors, der es ihnen ermöglicht, CD1d:Lipidantigenkomplexe zu binden anstatt Komplexe aus Peptid und MHC Molekül, wie es bei konventionellen T Zellen der Fall ist. Durch die vorgegebene Kombination von *AV14* und *AJ18* (*AV24* und *AJ18* beim Menschen) sind die antigenkontaktierenden Regionen der  $\alpha$ -Kette, die durch diese Gene codiert werden, invariabel. CDR1 $\alpha$  sowie CDR2 $\alpha$  werden vollständig durch das *AV14* Gensegment codiert, während CDR3 $\alpha$  durch den Übergang von *AV14* zu *AJ18* (Aminosäure 93) und dem Gensegment *AJ18* selbst codiert wird. Somit kann innerhalb der  $\alpha$  Kette allein in der CDR3 $\alpha$  Sequenz an Position 93 durch Hinzufügen von P- oder N Nukleotiden während des Umlagerungsprozesses Diversität auftreten [26, 65]. Aufgrund der begrenzten Auswahl an verwendeten *BV* Gensegmenten (vorwiegend *BV8S2* und *BV7* in der Maus sowie das *BV8S2* Homolog *BV11* bei Menschen) sind auch die hierdurch codierten Regionen CDR1 $\beta$  sowie CDR2 $\beta$  nur wenig variabel. Allein CDR3 $\beta$  kann im iNKT TCR als hoch divers angesehen werden, da es eine Vielzahl an genutzten *BD* und *BJ* Gensegmentkombinationen gibt. Dennoch ist die Bindung des iNKT TCR an CD1d:Lipidantigen Komplexe im Vergleich zu MHC restringierten T Zellrezeptoren kaum variabel [66], was auch in der stark abweichenden Bindungsweise des iNKT TCR an CD1d Moleküle begründet liegt. Strukturanalysen dieser Interaktion im Vergleich zur Interaktion von TCR und MHC Molekülen zeigen eine Rotation des TCR hinsichtlich des CD1d Moleküls, so dass  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten parallel der CD1d Bindungsfurche angeordnet werden, im Gegensatz zu der diagonalen Bindung des konventionellen TCR (vgl. Abb. 1.3) [67]. Zugleich ist eine laterale Verschiebung des iNKT TCR zu erkennen, welche die  $\alpha$  Kette zentral über der F' Tasche sowie den Aminosäuren 79-89 ( $\alpha_1$  Helix) und 147-151 ( $\alpha_2$  Helix) der CD1d Bindungsfurche positio-



**Abbildung 1.3:** Struktur der Interaktion von iNKT TCR und CD1d. [67]

niert, wohingegen die  $\beta$ -Kette lateral positioniert ist. Diese Verschiebungen resultieren in einer distinkten Kontaktfläche zwischen TCR und CD1d, hinsichtlich der für die Antigenbindung entscheidenden Regionen. So sind bei der Interaktion zwischen iNKT TCR und CD1d: $\alpha$ GC Komplexen die CDR der  $\beta$  Kette mit Ausnahme von CDR2 $\beta$  nicht beteiligt, welches lateral zur Stabilisierung beiträgt. Ebenso trägt CDR2 $\alpha$  nicht zur direkten Bindung bei. CDR1 $\alpha$  bindet exklusiv an das von CD1d präsentierte Antigen, während CDR3 $\alpha$  als einziges CDR sowohl Antigen als auch die  $\alpha$  Helices der CD1d Bindungsfurche kontaktiert (vgl. Abb. 1.4) [67, 68]. Die spezifische Nutzung dieser CDR Bereiche erklärt auch die Notwendigkeit einer invarianten  $\alpha$  Kette mit konservierter *AV14/AJ18* Umlagerung, sowie die Einschränkung der *BV* Variabilität, während die Umlagerung der  $\beta$  Kette divers ist. Die zur Interaktion genutzten CDR sind damit nahezu als keimbahncodiert anzusehen und die Ligandinteraktion des iNKT TCR gleicht mehr der konservierten Bindung von Rezeptoren des natürlichen Immunsystems als der hoch variablen Interaktion konventioneller T Zellrezeptoren.

Bindungsstudien bestätigten die dominante Rolle der CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$  und CDR2 $\beta$  Regionen auf die CD1d: $\alpha$ GC Bindung des iNKT TCR [69–71], aber zeigten ebenso den Einfluss des CDR1 $\beta$  sowie den Einbezug des CDR3 $\beta$  bei Bindung von CD1d:Lipid Komplexen mit schwächeren Lipidantigenen [72, 73]. Hierbei wird die Bindung des iNKT TCR durch zusätzlichen Kontakt des CDR3 $\beta$  mit der  $\alpha_2$  Helix des CD1d stabilisiert [67, 74]. Die Bindung des NKT TCR wird also, vor allem bei potenten Antigenen, weitgehend von der  $\alpha$  Kette dominiert, während die  $\beta$  Kette zur weiteren Stabilisierung dieser Interaktion beiträgt. Den Hauptanteil an der Interaktion trägt das CDR3 $\alpha$ , welches, bis auf den V-J Übergang (Position 93), allein durch das *AJ18* Gensegment codiert wird. Natürlich auftretende Abweichungen des V-J Übergangs von der kanonischen Sequenz der  $\alpha$  Kette führen zu einer starken Beeinträchtigung der Bindung verschiedener Antigene im humanen System [75]. Doch auch bei Bindung an schwächere Lipidantigene bleibt die prinzipielle Bindungsweise des iNKT TCR hoch konserviert [66, 76, 77].



**Abbildung 1.4:** Struktur der Kontaktfläche zwischen iNKT TCR und CD1d. [67]

### 1.3.4 iNKT Zellen der Ratte

Die Charakterisierung der iNKT Zellpopulation in F344 Ratten ergab eine Frequenz von etwa 0,2% der intrahepatischen Lymphozyten (IHL) bzw. 0,02% der Milzzellen, während LEW Ratten eine iNKT Zelldefizienz aufwiesen [78]. Ähnlich der Maus sind die Anteile an iNKT Zellen auch bei Ratten in der Leber am höchsten, jedoch deutlich niedriger als in Mäusen, in welchen bis zu 30% iNKT Zellen in der Leber gefunden werden können [50]. Neben den niedrigen Frequenzen an iNKT Zellen ist das Auftreten einer  $CD8\alpha^+$  iNKT Population ein weitere Parallele zur iNKT Zellpopulation des Menschen [78] und macht die Ratte für einen Einsatz als Modellorgansimus für iNKT Zell basierte Studien interessant. Die direkte Färbung des liniendefinierenden TCR mittels Ligandkomplexe, als letzter Nachweis einer iNKT Zellpopulation in der Ratte, wurde erst durch Generierung und Einsatz von Ratten CD1d Dimeren möglich [78, 79]. Zuvor waren jedoch bereits die meisten zu deren Entwicklung benötigten Gene und deren Expression charakterisiert: Ratten besitzen ein *CD1D* Gen, welches hoch homolog zu dem der Maus ist [80, 81] und ebenso ein der Maus ähnliches Expressionsmuster aufweist [82]. Außerdem wurden in der Ratte mehrere *AV14* Homologe in Umlagerung mit *AJ18* [83, 84] und zwei dem *BV8S2* Gensegment der Maus homologe *BV* Segmente (*BV8S2* und *BV8S4*) gefunden, die in F344 Ratten (*Tcrb<sup>a</sup>* Haplotyp) beide funktionell sind. Im Gegensatz hierzu ist bei LEW Ratten (*Tcrb<sup>l</sup>* Haplotyp) *BV8S4* als nichtfunktionelles Pseudogen vorhanden [85]. Eine erstaunliche Eigenheit der Ratte ist das Auftreten einer *AV14* Multigenfamilie von bis zu zehn Gensegmenten, wovon neun funktionell sind. In F344 Ratten wurden sechs *AV14* Gensegmente beschrieben, inklusive eines Pseudogens [84]. Diese unterscheiden sich neben dem HV4 (Hypervariable Region 4) vor allem in ihren CDR2 Sequenzen und werden anhand dieser Unterschiede in zwei Gruppen (Typ 1 und 2) eingeteilt. Der Befund einer organspezifischen Verteilung von Typ 1 und 2 *AV14* exprimierenden iNKT Zellen in der Ratte [83] konnten nicht bestätigt werden [78]. Während sich die *rAV14* Gensegmente der Ratte im CDR2 $\alpha$  deutlich unterscheiden, ist die in Mensch und Maus maßgeblich zur Bindung beitragende CDR1 $\alpha$  Region nahezu identisch [84]. Der CDR3 $\alpha$  wird, wie zuvor beschrieben, fast ausschließlich durch *AJ18* codiert und ist daher unabhängig des genutzten *AV14* Gensegments. Unterschiede zu der kanonischen Umlagerung von *AV14* und *AJ18* können jedoch, durch Einfügen von P- und N Nukleotiden, während der somatischen Rekombination auftreten [26, 65]. Tatsächlich ist ein Merkmal der Ratten iNKT Zellpopulation das vermehrte Auftreten von nicht kanonischen Umlagerungen,

bei denen das keimbahncodierte Alanin an Position 93 durch Glycin ersetzt wurde [78, 83]. Eine weitere erstaunliche Beobachtung ist das Auftreten von Speziespezifität in Hinsicht auf Bindung zwischen iNKT TCR und CD1d. Während bei anderen Spezies, wie Maus und Mensch, die semi-invarianten TCR der iNKT Zellen jeweils an  $\alpha$ GC beladene CD1d Dimere der anderen Spezies binden [86, 87], ist diese Eigenschaft in der Ratte verloren gegangen [69, 78].

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Der hohe Grad an theoretischer Variabilität des Ratten iNKT TCR eröffnet die Möglichkeit einer erweiterten Diversifizierung der Rezeptorspezifität innerhalb eines für seine Uniformität charakteristischen Systems. Im Zuge dieser Arbeit soll nun die Bindungseigenschaft verschiedener Ratten iNKT TCR verglichen und die Auswirkung der jeweiligen Sequenzunterschiede auf diese charakterisiert werden. Weiterhin ist die iNKT TCR Expression, deren Vielfalt innerhalb der primären Ratten iNKT Zellpopulation und der Einfluss der Diversität auf diese zu untersuchen. Zu welchem Grad wird die theoretische Rezeptorvielfalt genutzt? Existieren anhand ihrer Rezeptoraffinität voneinander abgrenzbare Subpopulationen an iNKT Zellen oder bleibt die Homogenität der Ligandbindung trotz Sequenzunterschiede erhalten? Als wichtigste Hilfsmittel zur Untersuchung von iNKT Zellen der Ratte soll im Zuge dieser Arbeit auch die von Elisa Monzon-Casanova etablierten Methoden der CD1d Dimerfärbung sowie der *in vitro* Expansion von Ratten iNKT Zellen weiter entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Tiere

Alle verwendeten Tiere waren im Alter zwischen 6 und 20 Wochen. LEW/CrI, F344/CrI sowie F1 (F344xLEW) wurden im Tierstall des Instituts für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland gezüchtet.

#### 2.1.2 Zelllinien

293T	Ursprünglich 293tsA1609neo. Verpackungslinie für retrovirale Transfektion. (ATCC CRL-1573)
BW58	Vom Do-11.10.7 Hybridom abstammende, TCR negative AKR/J Maus Lymphomlinie. (ATCC TIB-233) [88]
BW5417	TCR negative Maus Thymom Zelllinie
BW r/mCD28	BW58 Zellen (TCR <sup>-</sup> Maus T-Zell-Hybridomzelllinie), mit einem chimeren (Ratte/Maus) CD28 Molekül transduziert [89].
J558L	Maus Myelomzelllinie. Variante der J558 Zelllinie, entstanden durch spontanen Verlust der schweren Kette [90].
J558L pXIg mCD1d	Mit pXIg Maus CD1d transfizierte J558L Zelllinie zur mCD1d Dimerproduktion. [79]



J558L pXIg rCD1d	Mit pXIg Ratten CD1d transfizierte J558L Zelllinie zur rCD1d Dimerproduktion. [79]
Jurkat 1369	Humane T Zell Lymphomlinie, mit einem humanen iNKT TCR ([74]) transduziert. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Gado-la).
Jurkat 4C12	Humane T Zell Lymphomlinie, mit einem humanen iNKT TCR ([74]) transduziert. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Gado-la).
RAJI	Menschliche Burkitt-Lymphomzelllinie. (ATCC CC1-86)
RAJI huCD1d	Mit humanem CD1d transduzierte RAJI Zelllinie zur Antigenpräsentation.
RAJI mCD1d	Mit Maus CD1d transduzierte RAJI Zelllinie zur Antigenpräsentation. [69]
RAJI rCD1d	Mit Ratten CD1d transduzierte RAJI Zelllinie zur Antigenpräsentation. [69]

### 2.1.3 Reagenzien

Produkt	Hersteller
Acrylamid	AppliChem
Agarose NEEO Ultra - Qualität	Roth
$\alpha$ GC	Alexis Biochemicals

## 2 Material und Methoden

$\alpha$ GC Derivate	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Savage (PBS44, PBS57 [91]) und Dr. Steven Porcelli (DB01-1 [92])
Ampicillin	Gibco BLR
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco BLR
Biozym LE GP Agarose	Biozyme
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth
Coomassie R250	Sigma
Diethylamin	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
dNTP Set	Peqlab Biotechnologie
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
Essigsäure	AppliChem
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma
G418	Biochrom
Glukose (D(+))Glukose-Monohydrat	Roth
Glycerin	AppliChem
Hypozanthine-Aminopterin-Thymidine (HAT)	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Histopaque 1077	Sigma
Isopropanol	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	AppliChem
LB-Pulvermedium	AppliChem
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	Ferak
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	AppliChem
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Roth

Natrium-Butyrat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Percoll	GE Healthcare
Polybren	Sigma-Aldrich
Polyethyleneglycol (PEG)	Boehringer Mannheim
Protein G Sepharose	GE Healthcare
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
SOB (Super Optimal Broth)-Pulvermedium	AppliChem
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	AppliChem
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris) ultrapure	AppliChem
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma
Tween	Sigma
Tyloxapol	Sigma

#### 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Agarose-Platten	25 g LB-Pulvermedium 15 g Agarose 1 l dH <sub>2</sub> O autoklavieren unter sterilen Bedingungen bei 50°C mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzen und auf 9 cm Nicht-Gewebekultur-Petrischalen aufteilen (20 ml/Schale)
-----------------	---

## 2 Material und Methoden

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)	100 mg Ampicillin-Pulver in 1 ml 70% Ethanol
ATV	80 g NaCl 4 g KCl 10 g D-(+)-Glukose 5,8 g NaHCO <sub>3</sub> 5 g Trypsin 2 g EDTA auf 10 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
BSS I	50 g Glukose 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 11,9 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4 g Phenolrot auf 5 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen 110 ml der Lösung mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
BSS II	9,3 g CaCl <sub>2</sub> 20 g KCl 400 g NaCl 10 g MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O 10 g MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O auf 5 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen 110 ml der Lösung mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
BSS/BSA	0,2% BSA in BSS
ConA Überstand	Überstand von F344 Milzkultur (48 h, 1*10 <sup>7</sup> Zellen pro 1 ml RPMI Medium plus 3 µg/ml Concanavalin A (ConA)) steril filtrieren

	+ 20 mM $\alpha$ -Methylmannoside
DMEM <sup>-</sup> (ohne HEPES)	Invitrogen
DMEM <sup>-</sup> Kulturmedium	zu 500 ml DMEM <sup>-</sup> wurden 50 ml FCS (10% Endkonzentration) und 1,2 ml Streptomycin-Penicillin-Lösung gegeben
DMEM <sup>+</sup> (mit HEPES)	Invitrogen
DMEM <sup>+</sup> Kulturmedium	zu 500 ml DMEM <sup>+</sup> wurden 50 ml FCS (10% Endkonzentration) und 1,2 ml Streptomycin-Penicillin-Lösung gegeben
Einfriermedium	50% FCS 40% RPMI 1640 10% DMSO
ELISA Coating Buffer (0,1 M Bicarbonatpuffer)	0,84 g NaHCO <sub>3</sub> 0,356 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> mit dH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen Lösung auf pH 9,5 einstellen
ELISA Blocking Reagenz	PBS mit 5% FCS
ELISA Washing Buffer	1 l PBS mit 500 $\mu$ l Tween
Elutionspuffer	50 mM Diethylamin pH auf 11 einstellen
FACS-Puffer	0,1% BSA + 0,05% NaN <sub>3</sub> in PBS

## 2 Material und Methoden

2x HBS	50 mM HEPES pH 7,1 10 mM KCl 12 mM Glukose 280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung sterilfiltrieren (45 µm) und auf pH 7,1 einstellen
ISF-1 Medium	Biochrom
Lagerungspuffer	PBS mit 0,9% NaN <sub>3</sub>
LB-Medium	25 g Lysogeny Broth (LB)-Pulvermedium 1 l dH <sub>2</sub> O autoklavieren vor Verwendung Ampicillin zugeben (Endkonzentration 100 µg/ml)
Neutralisationspuffer	2 M Tris pH auf 6 einstellen
PBS	0,2 g KCl 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 g MgCl <sub>2</sub> 8 g NaCl 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,167 g CaCl <sub>2</sub> •H <sub>2</sub> O 0,1 g MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O auf 10 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
RPMI 1640	Invitrogen

RPMI 1640 Kulturmedium	zu 500 ml RPMI 1640 wurden 50 ml SC-Supplement und 25 ml FCS (Endkonzentration 10% FCS) gegeben.
SC-Supplement	50% hitzeinaktiviertes FCS 10% 100 mM Natriumpyruvat 10% nichtessentielle Aminosäuren 10% Penicillin-Streptomycin (10 kU/ml) 5,84% Glutaminlösung (5%-ig) 0,5% 50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
SDS-PAGE Entfärbelösung	12,5% Isopropanol 10% Essigsäure
SDS-PAGE Färbelösung	12,5% Isopropanol 10% Essigsäure 0,25% Coomassie Brilliant Blue R250
S.O.C.-Medium	25,5 g Super Optimal Broth (SOB)-Pulvermedium in dH <sub>2</sub> O lösen auf pH 7,0 einstellen mit dH <sub>2</sub> O auf 980 ml auffüllen autoklavieren 20 ml Glukoselösung (1 M) zugeben
Streptomycin- Penicillin-Lösung	5 g Streptomycin 5 g Penicillin in 50 ml dH <sub>2</sub> O lösen
Tris-Ammoniumchlorid (TAC) Puffer	20 mM Tris pH 7.2 0.82% NH <sub>4</sub> Cl in H <sub>2</sub> O

## 2 Material und Methoden

	steril filtrieren
5x TBE	54 g Tris base 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8 auf 1 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen autoklavieren
TE (pH 8)	10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA (pH 8)
5x TGS	15,1 g Tris 94 g Glycin 50 ml SDS (10%) mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
1,0 M Tris (pH 6,8)	121,1 g Tris base in 700 ml dH <sub>2</sub> O lösen pH einstellen auf 1 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
1,5 M Tris (pH 8,8)	181,65 g Tris base in 700 ml dH <sub>2</sub> O lösen pH einstellen auf 1 l mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
Waschpuffer	PBS 1 M NaCl

### 2.1.5 Vektoren



pEGZ	pIZ Vektor, der zusätzlich zum Zeozin Resistenzgen ein EGF Gen beinhaltet (EGFP-Zeozin Fusionsgen). (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Berberich)[93]
pEGN	pEGZ Vektor, der statt des Zeozin Resistenzgens ein Neomycin Resistenzgen beinhaltet (EGFP-Neomycin Fusionsgen). (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Berberich)[93]
pHIT 60	Codiert für die <i>gag</i> und <i>pol</i> Proteine des Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV). (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Lindemann) [94]
pIZ	Retroviraler Vektor, der vom Murinen Leukämie Virus (MuLV) entstammt. Er kann für die konstitutive, MuLV vermittelte Expression darin enthaltener Gene verwendet werden und trägt zudem ein Zeozin Resistenzgen. Die Expression des Resistenzgens ist IRES vermittelt. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Berberich) [95]
pczVSV-G	Codiert für das <i>env</i> Protein des Vesicular Stomatitis Virus. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Lindemann) [96]
pXIg	Beihaltet <i>MluI</i> und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstellen. Codiert für die Signalsequenz der Maus IgG1 Schwere Kette 5' der <i>MluI</i> Schnittstelle und für die Maus IgG1 Schwere Kette 3' der <i>XhoI</i> Schnittstelle [97]. Entstanden aus dem Plasmid pSN-RCR2, welches das Gen einer Maus IgG1 Schwere Kette enthält, die spezifisch für das Hapten NP ist [98].
SFG-GFP (S65T)	Retroviraler Expressionsvektor, codiert für ein Fragment des GFP Gens zwischen den <i>NcoI/BamHI</i> Schnittstellen. [99]

S65T CDR(2+4) Retroviraler Expressionsvektor, bei dem das ursprünglich im SFG-GFP codierte Fragment des GFP Gens zwischen den *NcoI/BamHI* Schnittstellen durch die Ratten TCR  $\beta$ -Kette ersetzt wurde. [100]

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5' nach 3' Orientierung angegeben. Alle Oligonukleotide wurden von Sigma Aldrich synthetisiert. Primer E4 und E6: Erstellt von E. Pyz. Primer E50, E51 und E118: Erstellt von E. Monzon-Casanova. Primer R17 und R18: Erstellt von R. Rudolf.

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz
C1 RC beta 1 mid	CAGAAACCCTCAAGGCGGCTGC
D9 VA14JA18 S1 A93V fwd	CTGTGTGGTGGTCGATAGAGG
D10 VA14JA18 S1 A93V rev	CCTCTATCGACCACCACACAG
D11 VA14JA18 S8 V93A fwd	CTGTGTGGTGGCCGATAGAGG
D12 VA14JA18 S8 V93A rev	CCTCTATCGGCCACCACACAG
D13 VA14JA18 S6 A93S fwd	CTGTGTGGTGTCCGATAGAGG
D14 VA14JA18 S6 A93S rev	CCTCTATCGGACACCACACAG
D15 VA14JA18 S6 A93G fwd	CTGTGTGGTGGGCGATAGAGG
D16 VA14JA18 S6 A93G rev	CCTCTATCGCCCACCACACAG
D17 VA14 S6 CDR2a Typ2 fwd	CAGTCCTGGCATAACAAGAAAGAGAAAAC
D18 VA14 S6 CDR2a Typ2 rev	GTTTTCTCTTTCTTGTATGCCAGGACTG
D19 VA14 S6 K56T R59S fwd	AGAAAGAGACAACATCAAGCGGAAGATAC
D20 VA14 S6 K56T R59S rev	GTATCTTCCGCTTGATGTTGTCTCTTTCT
D21 VA14 S2 CDR2a Typ1 fwd	CAGTCCTTACAAACAAAGAGGAGACGAC
D22 VA14 S2 CDR2a Typ1 rev	GTCGTCTCCTCTTTGTTTGTAAGGACTG
D23 mAV14 EcoRI fwd	GGGGAATTCAACCATGAAAAAGCGCC
D24 mAC BamHI rev	CCCGGATCCCTCAACTGGACCACAGCC
D26 VA14 S6 A68E fwd	CTCTGGATGAAGACGCTAAGCA

D27	VA14 S6 A68E rev	TGCTTAGCGTCTTCATCCAGAG
D28	VA14 S2 E68A fwd	CTCTGGATGCAGACGCTAAGCA
D29	VA14 S2 E68A rev	TGCTTAGCGTCTGCATCCAGAG
D34	FLSNP C15 fwd	TGGCGGCTGTGAGAGATGAC
D35	FLSNP C15 rev	TAACTCCAGCCCCCATCTGTTC
D39	huCD1d alpha3 XhoI rev	GTCACTCGAGGCTCCCACCCCAGTAGAGG
D44	beta8.2 BamHI rev	CCGGATCCTCAGGAACTCTTTCTTTTGACCATAGCC
D61	beta8.2 Pagi fwd	GCGCGCCATCATGAGCTCCAGGTTCTCTTAG
D64	huCD1d alpha1 MluI fwd	GTCCACGCGTCGGCTGAAGTCCCGCAAAGGC
D65	huTRAV10 EcoRI fwd	GGGCTAGAATTCTGCAGAAAAACCATGAAAAAGCATCTGACGACC
D66	huTRAC BamHI rev	ATGCGGATCCTCAGCTGGACCACAGCCGCA
D69	huTRBV11 NcoI fwd	GCGCGCCATCATGACTATCAGGCTCCTCTGCTACATGGGC
D70	huTRBV11 BamHI fwd	CCGGATCCCTAGCCTCTGGAATCCTTTCTCTTGACCATGGCC
D71	huAV24 S93G fwd	CTGTGTGGTGGGCGACAGAGGCTCAACCC
D72	huAV24 S93G rev	GGGTTGAGCCTCTGTCTCGCCCACCACACAG
D78	mAV14 K68A fwd	CTCTGGATGCAGATGCTAAGCAC
D79	mAV14 K68A rev	GTGCTTAGCATCTGCATCCAGAG
D88	huAV24 A68E fwd	GCAACTCTGGATGAAGACACAAAGC
D89	huAV24 A68E rev	GCTTTGTGTCTTCATCCAGAGTTGC
D92	rBV8S2 mid fwd	CCCCCTCTCAGACATCTGTGTAC
D93	rBV8S2 mid rev	GTACACAGATGTCTGAGAGGGGG
E4	rAV14 EcoRI Fow	GGGCTAGAATTCTGCAGAAAAACCATGGGGAAG
E6	Ca end BamHI antisense	ATGCGGATCCTCAACTGGACCACAGCCTTAGCGTCATGAG
E50	rVa14lead gDNA f	CTTCTGCAGAAAAACCATGGGGAAG
E51	rJa18lead gDNA r	AGGTGTGACAGTCAGCTGAGTTCC
E118	rCa seq2nd 118	AGTCGGTGAACAGGCAGAGGG
R17	RNBetaActFwd	CACCACCACAGCTGAGAGG
R18	RNBetaActRev	AGACAGCACTGTGTTGGCATAG

### 2.1.7 Antikörper und Oligomere

**Tabelle 2.2:** Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Klon	Konjugierung	Isotyp	Hersteller
r/mCD1d	233 (WTH1)	FITC/unkonj.	Maus IgG <sub>2a,κ</sub>	AG Herrmann
r/mCD1d	35 (WTH2)	Bio/unkonj.	Maus IgG <sub>2a,κ</sub>	AG Herrmann
mCD3ε	500A2	Bio/unkonj.	Hamster IgG <sub>2,κ</sub>	BD
rCD28	JJ316	unkonj.	Maus IgG <sub>1,κ</sub>	BD
rCD28	JJ319	unkonj.	Maus IgG <sub>1,κ</sub>	BD
rTCRβ	R73	FITC	Maus IgG <sub>1,κ</sub>	BD
rVβ8.4 <sup>a</sup>	R78	Bio	Maus IgG <sub>1,κ</sub>	BD
mIgG (H+L)		PE	Esel F(ab') <sub>2</sub>	Jackson
mIgG		HRP/unkonj.		Bethyl

Biotinylierte Antikörper wurden mittels APC (Durchflusscytometrie) bzw. HRP (ELISA) konjugiertem Streptavidin detektiert.

PE konjugierte Ratten CD1d Tetramere (PBS57 beladen und unbeladen) wurden freundlicherweise von der NIH Tetramer Core Facility (contract HHSN272201300006C) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8 Kits

BD OptEIA <sup>TM</sup> Mouse IL-2 ELISA Set	BD Biosciences
BD OptEIA <sup>TM</sup> TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
BigDye Term v3.1 CycleSeq Kit	Applied Biosystems
DNase I Kit	Fermentas/Thermo Scientific
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
GeneJET <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit	Fermentas/Thermo Scientific
JETQuick DNA Clean Up Spin Kit 50	Genomed
JETsorb Gel Extraction Kit/150	Genomed

JETstar Midi-Präparations-Kit	Genomed
MiniElute <sup>TM</sup> Gel Extraction Kit	Quiagen
Mouse IgG ELISA Kit	Bethyl
PCR Master Mix mit Taq DNA Polymerase	Fermentas/Thermo Scientific
Phusion <sup>TM</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen
QIAshredder	Qiagen
RNAeasy Mini Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme ( <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i> , <i>MluI</i> , <i>PagI</i> , <i>PvuI</i> , <i>XhoI</i> )	Fermentas/Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	Fermentas

### 2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Melag
Bakterienschüttler Ceromat	Melag
Brutschrank	Hotpack
Cellsorter FACSAria III	Becton & Dickinson
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton & Dickinson
Durchflusszytometer FACSCan	Becton & Dickinson
Durchflusszytometer FACSVantage	Becton & Dickinson
Einstellbare Pipetten	Eppendorf
Einstellbare Pipetten	Brand
Einstellbare Pipetten	Gilson
Eismaschine	Scotsman
Heizblock (1,5 ml)	Liebisch
Heizblock TDB-120 (2 ml)	Thermostat
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss

## 2 Material und Methoden

Gene Pulser II	BioRad
Micropipette 0,5-1,5 ml	Socorex
Mikroskop	Labovert
Mini Protean 3 Cell	BioRad
Multipette plus	Eppendorf
pH-Meter	Pulse
Pipettierhilfe	Brand
Sequenzer ABI prism 3100	Perkin Elmer
Spectrophotometer NanoDrop 2000c	ThermoScientific
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	Eppendorf
Transferpipette 10-50 $\mu$ l	Brand
Vmax Kinetic Microplate Reader	Molecular Devices
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Scaltec
Wasserbadthermostat	MT Lauda

### 2.1.10 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
6-Well Platten (Flachboden)	Greiner
12-Well Platten (Flachboden)	Greiner
24-Well Platten (Flachboden)	Greiner
48-Well Platten (Flachboden)	Greiner
96-Well Platten (Flachboden)	Greiner
96-Well Platten (Rundboden)	Greiner
Dynabeads <sup>®</sup> pan mIgG	Life technologies
Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenlücke)	BioRad
Einmalspritzen (2 ml und 5 ml)	Becton & Dickinson

Polystyren half-area	Corning Incorporated
96-Well Platten, klar	
Gewebekulturflaschen (50 ml und 200 ml)	Greiner
Gewebekulturpetrischalen (Ø 6 cm)	Sarstedt
Gewebekulturpetrischale (Ø 10 cm)	Greiner
Glaspasteurpipetten mit/ohne Filter (1,5 ml)	Vertrieb durch Laborbedarf Scheller
Kryoröhrchen	Sarstedt
Nicht-Gewebekulturschalen (Ø 9 cm)	Greiner
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Roth
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
Poly-Prep Säulen (9 cm)	Bio-Rad
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Spitzen für Multipipetten	Eppendorf
Sterilfilter (0,25 µm und 0,45 µm)	Whatman
Vivaspin 20 ml 50.000 MW Säulen	Sartorius Stedim Biotech
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner

### 2.1.11 Computersoftware und Internetadressen

Software	Hersteller
CellQuest	Becton & Dickinson
ChemBioDraw	CambridgeSoft
Excel	Microsoft
FlowJo	Tree Star
GIMP	Das GIMP Team
PowerPoint	Microsoft
Prism	GraphPad
The PyMOL Molecular Graphics System	Schrödinger, LLC

T<sub>E</sub>XShop

GPL public licence Ri-  
chard Koch

Internetadressen

---

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.expasy.org/spdbv/>



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Restriktionsverdau und Ligation von Insert und Vektoren

Der Restriktionsverdau zur Vorbereitung einer Ligation erfolgte für 2 h nach Herstellerangaben mittels der entsprechenden Restriktionsenzyme. Die Aufreinigung von Insert und Vektor nach Restriktionsverdau erfolgte mittels Agarosegel. Der Restriktionsverdau zur Überprüfung einer Ligation nach Isolierung aus Bakterienkulturen erfolgte für 1 h nach Herstellerangaben mittels der entsprechenden Restriktionsenzyme. Der Verdau wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die Ligation aufgereinigten Inserts und Vektors im Verhältnis 3:1 erfolgte mittels T4-Ligase (Fermentas) nach Herstellerangaben bei 4°C über Nacht (o.n.).

#### 2.2.1.2 Gelelektrophorese und DNA Extraktion aus Agarosegelen

Zur Analyse von DNA Fragmenten mittels Gelelektrophorese wurden 1% Agarosegele genutzt. Die DNA wurde nach Herstellerangaben mit Laufpuffer (Loading Dye, Fermentas) versetzt und nach Auftragen auf das Gel bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt.

Die Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

#### 2.2.1.3 Transformation von Bakterien

Zur Transformation kompetenter Bakterien wurde bei 4°C 1-2  $\mu$ l Ligationsansatz zu 50  $\mu$ l Bakterien gegeben. Es folgten 10 min Inkubation bei 4°C, 30 sek Inkubation bei 42°C und 2 min Inkubation bei 4°C. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l S.O.C. Medium wurde die Bakterienkultur für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien wurde die Kultur auf Agarplatten mit dem Vektor entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.1.4 DNA Mini- und Midipräparation zur Isolierung von Plasmiden

Zur Überprüfung von Plasmiden erfolgreich transformierter Bakterienklone wurden je Klon 5 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einem Abstrich der auf

## 2 Material und Methoden

der Selektionsplatte wachsenden Bakterienkolonie angeimpft. Die Flüssigkultur wurde unter Schütteln bei 37°C o.n. inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der dicht bewachsenen Bakterienkultur bei 10.000 rpm und RT für 2 min pelletiert, der Überstand abgenommen und in 250 µl Lösung E1 (JETstar 2.0 MIDI Kit, Genomed) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde 250 µl Lysispuffer E2 zugegeben, die Reaktionsgefäße mehrfach invertiert und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wurden 250 µl E3 Neutralisationspuffer zugegeben und die Ansätze wiederum mehrfach invertiert. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurde 10 min bei 14.000 rpm (RT) zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol wurde für 15 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett verworfen und 500 µl Ethanol (70%) zugegeben. Die Ansätze wurden bei 14.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA Pellets bei RT getrocknet. Die komplett getrockneten Pellets wurden in 15 µl TE Puffer aufgenommen. Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid wurden je Klon 50 ml LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einem Abstrich der auf der Selektionsplatte wachsenden Bakterienkolonie angeimpft. Die Flüssigkultur wurde unter Schütteln bei 37°C o.n. inkubiert. Die Isolierung der enthaltenen Plasmide erfolgte mittels JETstar 2.0 MIDI Kit (Genomed) nach Herstellerangaben.

### 2.2.1.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Die Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen erfolgte mit Hilfe der QIAshredder und RNeasy Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zur Isolierung von RNA aus (expandierten) primären Zellen wurden zwischen  $1 \cdot 10^6$  und  $3 \cdot 10^6$  Zellen verwendet.

### 2.2.1.6 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die spektrophotometrische Quantifizierung von RNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte mittels NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

### 2.2.1.7 cDNA Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Es wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA oder das maximale Volumen zur Synthese verwendet. Zur Vermeidung von Verunreinigung der RNA durch genomische DNA wurde ein DNase I Verdau (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt und nach Abstoppen des Verdau der Ansatz direkt zur cDNA Synthese verwendet. Zur Kontrolle der Ratten cDNA wurde  $\beta$ -Actin mittels der Primer R17 und R18 amplifiziert (vgl. Tabelle 2.1).

PCR Ansatz:

Template:	2 $\mu\text{l}$
Primer Mix (10 $\mu\text{M}$ ):	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O:	7 $\mu\text{l}$
2x PCR Master Mix:	10 $\mu\text{l}$
(Taq DNA Polymerase, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs)	

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	4 min	98°C	} 35 Zyklen
Denaturierung:	1 min	94°C	
Annealing:	1 min	74°C	
Elongation:	1 min	72°C	
Finale Elongation:	10 min	72°C	
Kühlung:	$\infty$	4°C	

### 2.2.1.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels BigDye Term v3.1 CycleSeq Kit (Applied Biosystems) und wurde in einem ABI 3100 Sequenzierer (Applied Biosystems) analysiert.

Ansatz Sequenzier-PCR:

aufgereinigte DNA:	3 $\mu\text{l}$ (750 ng)
--------------------	--------------------------

## 2 Material und Methoden

Primer (10 $\mu\text{M}$ ):	0,5 $\mu\text{l}$
5x BigDye <sup>®</sup> Terminator 3.1 Puffer:	0,5 $\mu\text{l}$
BigDye <sup>®</sup> Terminator 3.1:	1 $\mu\text{l}$

PCR Programm zur Sequenzierung:

Initiale Denaturierung:	30 sek	96°C	} 25 Zyklen
Denaturierung:	10 sek	96°C	
Annealing:	5 sek	50°C	
Elongation:	4 min	60°C	
Finale Elongation:	10 min	60°C	
Kühlung:	$\infty$	4°C	

### 2.2.1.9 Ortsspezifische Mutagenese von TCR $\alpha$ Ketten

Mutationen im V Segment der TCR $\alpha$  Ketten wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von überlappenden Primern eingeführt, welche die für die Punktmutationen benötigte minimale Änderung der Nukleotidsequenz beinhalteten. Die PCR wurde mit Hilfe der Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) durchgeführt. Mutierte TCR $\alpha$  Ketten wurden zurück in die *EcoRI/BamHI* Klonierungsstelle des pEGN Vektors kloniert. Hierzu wurden für Ratten TCR $\alpha$  Ketten die Primer E4 und E6 verwendet, für Maus TCR $\alpha$  Ketten D23 und D24, für humane TCR $\alpha$  Ketten D65 und D66 (vgl. Tabelle 2.1). Alle Mutationen wurden mittels Sequenzierung des Inserts überprüft.

PCR Ansatz:

Template:	2 $\mu\text{l}$ (10 ng)
Primer Mix (10 $\mu\text{M}$ ):	2,5 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O:	35 $\mu\text{l}$
Phusion DNA Polymerase:	0,5 $\mu\text{l}$
Phusion HF Puffer:	10 $\mu\text{l}$
dNTPs:	1 $\mu\text{l}$

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	30 sek	98°C	} 30 Zyklen
Denaturierung:	10 sek	98°C	
Annealing:	30 sek	62°C	
Elongation:	30 sek	72°C	
Finale Elongation:	10 min	72°C	
Kühlung:	∞	4°C	

Verwendete Mutationsprimer:

Mutation	Mutationsprimer (vgl. Tabelle 2.1)
<i>rAV14S6</i> A93V	D9 + D10
<i>rAV14S8</i> V93A	D11 + D12
<i>rAV14S6</i> A93S	D13 + D14
<i>rAV14S6</i> A93G	D15 + D16
<i>rAV14S6</i> CDR2 $\alpha$ T1->2	D17 + D18
<i>rAV14S6</i> K56T R59S	D19 + D20
<i>rAV14S6</i> A68E	D26 + D27
<i>rAV14S2</i> CDR2 $\alpha$ T2->1	D21 + D22
<i>rAV14S2</i> E68A	D28 + D29
<i>mAV14</i> A93G	D15 + D16
<i>mAV14</i> K68A	D78 + D79
<i>huAV24</i> S93G	D71 + D72
<i>huAV24</i> A68E	D88 + D89

#### 2.2.1.10 Klonierung des humanen CD1d in pXIg

Die extrazellulären Domänen  $\alpha_{1-3}$  des humanen CD1d (GenBank: BC027926.1) wurden mittels der Primer D64 und D39 (vgl. Tabelle 2.1) aus EGN hCD1d (S. Schweigle, [82]) amplifiziert und in die *MluI/XhoI* Schnittstellen des pXIg Vektors kloniert. PCR Ansatz und PCR Programm siehe 2.2.1.9.

### 2.2.1.11 Klonierung des humanen iNKT TCR

$\alpha$  sowie  $\beta$  Ketten des humanen iNKT TCR wurde aus cDNA der transduzierten Jurkat 1369 Zelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Gadola) kloniert. Zur Klonierung der  $\alpha$  Kette wurden Primer D65 und D66 verwendet, zur Klonierung der  $\beta$  Kette Primer D69 und D70 (vgl. Tabelle 2.1). PCR Ansatz und PCR Programm siehe 2.2.1.9. Als Template wurden 2  $\mu$ l cDNA eingesetzt. Die humane iNKT  $\alpha$  Kette wurde in die *EcoRI/BamHI* Schnittstellen des EGN Vektors kloniert, die humane iNKT  $\beta$  Kette in die *NcoI/BamHI* Schnittstellen des S65T Vektors.

### 2.2.1.12 Klonierung der *rBV8S2* $\beta$ Kette

Die *rBV8S2*<sup>a</sup>  $\beta$  Kette wurde aus cDNA der F344 Ratten iNKT Hybridomlinie RID12 mittels Primer D61 + D44 amplifiziert (vgl. Tabelle 2.1) und anschließend in die *NcoI/BamHI* Schnittstellen des S65T Vektors kloniert. PCR Ansatz: siehe 2.2.1.9. Als Template wurden 2  $\mu$ l cDNA verwendet.

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	30 sek	98°C	} 35 Zyklen
Denaturierung:	10 sek	98°C	
Annealing:	30 sek	55°C	
Elongation:	30 sek	72°C	
Finale Elongation:	10 min	72°C	
Kühlung:	$\infty$	4°C	

### 2.2.1.13 Austausch des CDR3 $\beta$ Segments

Zum Austausch des CDR3 $\beta$  zwischen *rBV8S4* CDR3 $\beta$  #1 und *rBV8S2* CDR3 $\beta$  #2, wurde das *BV* Segment der CDR2+4 (*rBV8S4* ähnlichen)  $\beta$  Kette und der *BD-BC* Abschnitt der *rBV8S2* CDR3 $\beta$  #2  $\beta$  Kette mittels 5' des CDR3 $\beta$  überlappenden Primern (D92 und D93) und den Endprimern D61 + D44 (vgl. Tabelle 2.1) amplifiziert, mittels PCR vereinigt und anschließend in die *NcoI/BamHI* Schnittstellen des S65T Vektors kloniert.

PCR Programm: vgl. 2.2.1.9.

### 2.2.1.14 Analyse von *rAV14* TCR $\alpha$ Ketten

TCR $\alpha$  Ketten mit *rAV14* Segment wurden aus cDNA mittels der Primer E50 (im Leader des V $\alpha$ 14 lokalisiert) und E118 (Im C $\alpha$  lokalisiert) amplifiziert. Zur spezifischen Amplifizierung von iNKT typischen TCR $\alpha$  Ketten mit *AV14/AJ18* Umlagerung wurde Primer E51 statt E118 verwendet, der im *AJ18* Gensegment lokalisiert ist (vgl. Tabelle 2.1). PCR Ansatz: siehe 2.2.1.9. PCR Programm: siehe 2.2.1.12. Als Template wurden 2  $\mu$ l cDNA verwendet. Nach Aufreinigung der amplifizierten  $\alpha$ -Ketten, wurden diese mittels Primer E50 sequenziert.

### 2.2.1.15 Analyse der TCR $\beta$ Kette

Zur Analyse der *rBV* Expression bei expandierten iNKT Zellen oder polyklonal aktivierten T Zellen der Ratte wurde cDNA der entsprechenden Populationen generiert und mittels PCR analysiert. Hierbei wurde zur Amplifizierung der  $\beta$  Ketten Forward Primer eingesetzt, die spezifisch für die jeweilige Leader Sequenz verschiedener *rBV* Segmente waren und jeweils 18 bis 21 Nukleotide ab Beginn der Leader Sequenz umfassten, wie in [101] dargestellt. Als Reverse Primer wurde der im *rBC* Segment lokalisierte Primer C1 eingesetzt (vgl. Tabelle 2.1). PCR Ansatz: siehe 2.2.1.7. Als Template wurden je 500 ng cDNA eingesetzt.

PCR Programm:

Initiale Denaturierung:	4 min	92°C	} 26 Zyklen
Denaturierung:	1 min	92°C	
Annealing:	1 min	60°C	
Elongation:	1 min	72°C	
Finale Elongation:	10 min	72°C	
Kühlung:	$\infty$	4°C	

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 SDS-PAGE

Um Proteine ihrem Molekulargewicht nach im elektrischen Feld aufzutrennen, wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Ein Aliquot der zu untersuchenden Proteinlösung wurde mit reduzierendem Probenpuffer für 10 min bei 100°C

## 2 Material und Methoden

aufgekocht, 5 min auf Eis gestellt und vor Beladung kurz zentrifugiert. Gele wurden mit Hilfe einer BioRad Gelkammer gegossen. Zur Analyse der Fraktionen einer Dimeraufreinigung wurden 10%ige Trenngele und 3%ige Sammelgele verwendet, die Spannung während des Durchlaufens des Sammelgels betrug 80 V, während des Trenngels 120 V. Im Trenngel enthaltene Proteinbanden wurden mittels Coomassieblau Färbung sichtbar gemacht.

Sammelgel:

Volumen	5 ml	7,5 ml	10 ml	25 ml
<b>AA/Bis-AA)</b>	1,665 ml	2,4975 ml	3,33 ml	8,325 ml
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	1,25 ml	1,875 ml	2,5 ml	6,25 ml
<b>10% SDS</b>	50 $\mu$ l	75 $\mu$ l	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2 ml	3 ml	4 ml	10 ml
<b>TEMED</b>	5 $\mu$ l	7,5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l
<b>10% APS</b>	25 $\mu$ l	37,5 $\mu$ l	50 $\mu$ l	125 $\mu$ l

Trenngel:

Volumen	3 ml	6 ml	9 ml
<b>AA/Bis-AA</b>	390 $\mu$ l	780 $\mu$ l	1170 $\mu$ l
<b>1,0 M Tris (pH 6,8)</b>	375 $\mu$ l	750 $\mu$ l	1125 $\mu$ l
<b>10% SDS</b>	30 $\mu$ l	60 $\mu$ l	90 $\mu$ l
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	1,85 ml	3,7 ml	5,55 ml
<b>TEMED</b>	7 $\mu$ l	14 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>10% APS</b>	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	60 $\mu$ l



#### 2.2.2.2 Maus IL-2 ELISA

Die Bestimmung von Maus IL-2 im Zellkulturüberstand stimulierter Zellen erfolgte mit Hilfe des BD OptEIA<sup>TM</sup> Mouse IL-2 ELISA Sets (BD Biosciences) sowie des BD OptEIA<sup>TM</sup> TMB Substrate Reagent Sets (BD Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Messung der entwickelten ELISA Platten erfolgte bei 450 nm an einem Vmax Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices).

#### 2.2.2.3 Maus IgG<sub>1</sub> ELISA

Die Bestimmung von Maus IgG<sub>1</sub> im Zellkulturüberstand erfolgte mit Hilfe des Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit (BD Biosciences) sowie des BD OptEIA<sup>TM</sup> TMB Substrate Reagent Sets (BD Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Messung der entwickelten ELISA Platten erfolgte bei 450 nm an einem Vmax Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices).

#### 2.2.2.4 CD1d ELISA

Die Bestimmung der Konzentration von Maus oder Ratten CD1d Dimeren im Zellkulturüberstand erfolgte mittels CD1d ELISA. Polystyren half-area 96-Well Platten wurden mit dem unkonjugierten 233 (anti-m/r CD1d) monoklonalen Antikörper (10 µg/ml in 0,1 M Bicarbonatpuffer) bei 4°C über Nacht beschichtet. Beschichtete Platten wurden 5x mit ELISA Waschpuffer gewaschen, mit Blocking Reagenz (PBS 10% FCS) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und wie zuvor gewaschen. Die Proben wurden 2 h bei RT inkubiert und die Platte wie zuvor gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels biotinyliertem 35 (WTH2) (anti-m/r CD1d) monoklonalem Antikörper (200 ng/ml in Blocking Reagenz) für 1 h bei RT. Die Platten wurden wie zuvor gewaschen, mit SA-HRP (an Streptavidin gekoppelte Peroxidase, 1:2000 in Blocking Reagenz) für 30 min bei RT inkubiert und wiederum wie zuvor gewaschen. Die Analyse der Peroxidaseaktivität erfolgte mit Hilfe des BD OptEIA<sup>TM</sup> TMB Substrate Reagent Sets (BD Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Messung der entwickelten ELISA Platten erfolgte bei 450 nm an einem Vmax Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices). [79]

#### 2.2.2.5 Produktion von CD1d Dimeren

Mit pXIg CD1d (aus Ratte, Maus oder Mensch) transfizierte JJ58L Zellen wurden in serumfreien, mit 10 mM HEPES und 1 mg/ml G418 Antikiotikum versetztem Medium (ISF-1, Biochrom)

## 2 Material und Methoden

in hoher Dichte kultiviert und nach Erreichen des gewünschten Volumens bei 4200 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert und mit  $\text{NaN}_3$  in einer Endkonzentration von 0,05% versetzt.

Poly-Prep Säulen (9 cm), die 1 ml Protein G Sepharose in 8 ml Lagerungspuffer (PBS mit 0,09%  $\text{NaN}_3$ ) enthielten und bei 4°C gelagert wurden, wurden mit 10 ml Diethylamin (50 mM, pH 11) und 10 ml PBS gewaschen und mit dem gesamten Kulturüberstand bei 4°C in ständigem Durchlauf (1 ml/min) beladen. Die beladenen Säulen wurden mit 15 ml PBS und 8 ml PBS 1 M NaCl gewaschen. Die gebundenen Dimere wurden mit 5 ml Diethylamin (50 mM, pH 11) eluiert. Je 1 ml Elutionsfraktionen zu je 1 ml wurden aufgefangen und mit 62  $\mu\text{l}$  Tris (2 M, pH 6) versetzt. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml PBS gewaschen, wovon wiederum die erste Fraktion (1 ml) wie zuvor aufgefangen wurde. Die Säulen wurden mit 8 ml Lagerungspuffer befüllt und bei 4°C gelagert. Die Kulturüberstände wurden 3-6x aufgereinigt, um die Ausbeute zu maximieren. Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt getestet. Zur Lagerung wurden die Fraktionen mit  $\text{NaN}_3$  (Endkonzentration 0,02%) versetzt. Ausgewählte dimerhaltige Fraktionen wurden vermengt und mittels Vivaspin 20 50,000 MWCO Säulen (Stedim Biotech) nach Herstellerangaben in PBS umgepuffert und aufkonzentriert. Die Bestimmung der Konzentration aufgereinigter Dimere erfolgte mittels NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben als IgG<sub>1</sub> und wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Zur Lagerung bei 4°C wurden die Dimerlösungen mit  $\text{NaN}_3$  (Endkonzentration 0,02%) versetzt.

### 2.2.2.6 Beladung von CD1d Dimeren

Die Beladung von Dimeren erfolgte bei einer Dimerkonzentration von 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 40x molarem Überschuss an Lipid bei 37°C für 21-24 h in PBS 0,05% Triton X-100 (bei Beladung von PBS57: in PBS ohne Triton X-100).

### 2.2.2.7 Beschichtung von pan mIgG Dynabeads<sup>®</sup>

Zur Beschichtung von pan mIgG Dynabeads<sup>®</sup> (Life technologies) wurde die entsprechende Menge Beads 3x mit PBS gewaschen und bei einer Konzentration von  $4 \cdot 10^7/\text{ml}$  PBS beladen. Zur Beschichtung wurden 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mIgG Antikörper (ca. 150 kDa) bzw. 17  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CD1d Dimere (ca. 250 kDa) eingesetzt, um ein Verhältnis von 1:1 zu erreichen. Die Beschichtung erfolgte für 15-30 min bei 4°C unter kontinuierlicher Rotation. Nach erfolgter Beschichtung wurden die Beads wiederum 3x mit PBS gewaschen und anschließend in RPMI 1640 Kulturmedium

aufgenommen.

### 2.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 Kulturmedium kultiviert, adhärenente Zellen wurden in *DMEM* Kulturmedium kultiviert (vgl. 2.1.4).

#### 2.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren einer Zelllinie wurden  $1 \cdot 10^6$  bis  $5 \cdot 10^6$  Zellen pelletiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt, bei -70°C eingefroren und nach mehreren Wochen in -140°C überführt.

Zur Wiederaufnahme der Kultivierung gefrorener Zellen wurden diese zuvor bei RT aufgetaut und zweimalig mit Kulturmedium gewaschen.

#### 2.2.3.3 Transfektion von JJ58L

Die Transfektion von JJ58L Zellen mit pXIg huCD1d zur Produktion humaner Dimere erfolgte mittels Elektroporation an einem Gene Pulser II Elektroporationssystem (BioRad).  $1 \cdot 10^7$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS wurden mit 10  $\mu$ g pXIg huCD1d (linearisiert an *PvuI* Schnittstelle) in einer Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenlücke) 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 600  $\mu$ l PBS überschichtet. Die Elektroporation erfolgte bei folgenden Bedingungen: 280 V, 960  $\mu$ F, 0,5-1 kV/cm, 14,4 msec. Die Zellsuspension wurde 20 min auf Eis inkubiert, mit Kulturmedium gewaschen und in 24 Fraktionen zu je 1 ml RPMI 1640 Kulturmedium in einer 24 well Platte für 24 h inkubiert, bevor 1 mg/ml G418 Antikiotikum zur Selektion zugegeben wurde.

#### 2.2.3.4 Retrovirale Transduktion

Die Transfektion von 293T Zellen zur Produktion viraler Vektoren erfolgte mittels Calciumpräzipitation [94].

Tag 1:

## 2 Material und Methoden

$1,5 \cdot 10^6$  293T Zellen wurden in 5 ml DMEM<sup>+</sup> Kulturmedium in einer 6 cm Gewebekulturschale ausgesät.

Tag 2:

Das Medium der 293T Zellen wurde durch 4 ml vorgewärmtes DMEM<sup>-</sup> ersetzt und diese für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Präzipitation der DNA wurden zu je 5 µg pVSV-G, pHit60 und des zu transduzierenden Plasmids 62 µl CaCl<sub>2</sub> (2M) zugegeben und der Ansatz auf 500 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Separat wurden 500 µl 2x HBS in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben, die vorbereitete DNA unter Vortexen des 2x HBS langsam zu diesem zugetropft und für 15 min inkubiert. Der Präzipitationsansatz wurde vorsichtig auf die vorbereiteten 293T Zellen getropft und die Zellen 6 h bis 8 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch 5 ml vorgewärmtes DMEM<sup>+</sup> Kulturmedium ersetzt.

Tag 3:

Das Medium wurde abgenommen, durch 5 ml vorgewärmtes DMEM<sup>+</sup> (versetzt mit 10 mM Natriumbutyrat) ersetzt, für 6 h bis 7 h kultiviert und das Medium wiederum durch 5 ml vorgewärmtes DMEM<sup>+</sup> ersetzt.

Tag 4:

Zur Transduktion wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen der Zielzelllinie mit 3 ml viralem Überstand (filtriert mittels 45 µm Filter und versetzt mit 4 µg/ml Polybren) vermischt und für 3 h bei 32°C und 2.200 rpm zentrifugiert. Hierauf wurde der Überstand abgekippt, die Zellen in 3 ml frischem RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen und zur Kultivierung in eine 12 well Platte überführt.

### 2.2.3.5 Stimulation von Transduktanten

Die Stimulation von mit iNKT TCR transduzierten Bw r/mCD28 Zellen erfolgte mittels immobilisierter Antikörper und CD1d Dimeren in 96 well Flachboden Platten. Zur Beschichtung der Platten wurden JJ319 anti-rat CD28 mAb und verschiedenen beladene CD1d Dimere im Verhältnis 1:1 in PBS gemischt, titriert und je 50 µl zu jedem zu beschichtenden well gegeben. Die Beschichtung erfolgte bei 4°C o.n.. Vor Zugabe der Zellen wurde die Platte 3x mit je 200 µl PBS je well und 1x mit 200µl RPMI 1640 Kulturmedium je well gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml RPMI 1640 Kulturmedium eingestellt und je 200 µl ( $5 \cdot 10^4$  Zellen) zu einem beschichteten well gegeben. Die Ansätze wurden für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.3.6 Stimulation expandierter Ratten iNKT Zellen

Die Stimulation expandierter Ratten iNKT Zellen erfolgte mittels beschichteter pan mIgG Dynabeads<sup>®</sup>. Die Beads wurden mit JJ316 anti-rat CD28 mAb und verschieden beladenen CD1d Dimeren beschichtet und im Verhältnis 5:1 zu den zu stimulierenden Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte in 96 well Flachboden Platten für 24 h bei 37°C im Brutschrank.

### 2.2.3.7 Präparation von Thymocyten

Zur Entnahme des Thymus wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub> getötet. Die entnommenen Organe wurden zur Homogenisierung durch ein steriles Metallsieb gerieben und die Zellsuspension in insgesamt 14 ml BSS/BSA aufgenommen. Gewebstrümmer wurden durch Sedimentation (10 min in 15 ml Falcon) abgesondert und die im Überstand enthaltenen Zellen pelletiert, zweifach mit BSS/BSA bzw. RPMI 1640 Kulturmedium gewaschen (1600 rpm, 5 min, 4°C) und zur weiteren Verwendung gezählt.

### 2.2.3.8 Präparation von Milzzellen

Zur Entnahme der Milz wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub> getötet. Die entnommenen Organe wurden zur Homogenisierung durch ein steriles Metallsieb gerieben und die Zellsuspension in insgesamt 14 ml BSS/BSA aufgenommen. Gewebstrümmer wurden durch Sedimentation (10 min in 15 ml Falcon) abgesondert und die im Überstand enthaltenen Zellen pelletiert (1600 rpm, 5 min, 4°C). Zur Lyse der enthaltenen Erythrocyten wurde das Zellpellet in 5 ml TAC Puffer aufgenommen und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurde zweifach mit BSS/BSA bzw. RPMI 1640 Kulturmedium gewaschen und zur weiteren Verwendung gezählt.

### 2.2.3.9 Präparation von Intrahepatischen Lymphocyten

Zur Entnahme der Leber wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub> getötet. Vor Entnahme der Organe wurde eine Herzpunktion durchgeführt, um den Blutfluss im Tier zu reduzieren und die Leber wurde über die Portalvene mit 100 ml bis 150 ml BSS/BSA durchspült, um enthaltenes Blut zu entfernen. Nach vollständiger Entnahme der Leber wurde diese in 2 cm bis 3 cm große Stücke geschnitten, mit 5 ml BSS/BSA in einem Potter Elvehjem Homogenisator mit Teflonpistill homogenisiert und sukzessive in einem Gesamtvolumen von 50 ml BSS/BSA durch ein Metallsieb gerieben. Die Zellen wurden pelletiert und zur Isolation der Lymphocyten in 28 ml

## 2 Material und Methoden

Percollösung 1 (36% Percoll, 4% 10x PBS, 60% RPMI 1640 Kulturmedium) aufgenommen. Die entstandene Suspension wurde mit 12 ml Percollösung 2 (72% Percoll, 8% 10x PBS, 30% RPMI 1640 Kulturmedium) unterschichtet und zentrifugiert (2500 g, 24 min, RT, ohne Bremsen). Der gewebehaltige Überstand wurde abgesaugt und die in der Interphase befindlichen Lymphocyten gesammelt. Die Leberlymphocyten wurden zweifach mit BSS/BSA bzw. RPMI 1640 Kulturmedium gewaschen und zur weiteren Verwendung gezählt.

### 2.2.3.10 Expansion von iNKT Zellen

Zur Expansion von iNKT Zellen wurden Intrahepatische Lymphocyten (IHL) oder Milzzellen in Gegenwart des iNKT Zellspezifischen Antigens  $\alpha$ GC bzw. dessen Derivat PBS57 am Tag der Präparation in Kultur genommen [79]. Die Zellkultur erfolgte in RPMI 1640 Kulturmedium in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit. Die Kultur wurde alle sieben Tage mittels Durchflusszytometrie kontrolliert und neu angesetzt. Bedingungen während Tag 0 bis Tag 7:  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Gegenwart von 10 ng/ml PBS57 (oder 20 ng/ml  $\alpha$ GC) in einer 10 cm Gewebekulturpetrischale. Tag 7 bis Tag 14:  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in Gegenwart von 5 ng/ml PBS57 (oder 10 ng/ml  $\alpha$ GC) und 10% ConA Überstand in einer 200 ml Gewebekulturflasche. Tote Zellen wurden an Tag 7 aus der Kultur mittels Ficollgradienten entfernt. Hierzu wurden die Zellen der Expansionskultur pelletiert, in 12 ml RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen, mit 10 ml Histopaque 1077 (Sigma) unterschichtet und bei 2000 rpm, RT für 20 min zentriugiert. Die sich in der Interphase befindenden lebenden Zellen wurden gesammelt, zweifach mit RPMI 1640 Kulturmedium gewaschen und zur weiteren Verwendung gezählt.

### 2.2.3.11 Langzeitkultur isolierter iNKT Zellen

Zur langfristigen Kultivierung und weiteren Expansion von iNKT Zellen wurde die expandierte iNKT Zellpopulation von Ratten Milzzellen an Tag 14 der Expansionskultur mit Hilfe von rCD1d Dimeren oder Tetrameren gefärbt und durchflusszytometrisch isoliert. Hierzu wurden zunächst wie an Tag 7 der Expansionskultur tote Zellen aus der Kultur entfernt und die verbleibenden Zellen gewaschen, pelletiert und zur Färbung in PBS 0,1% BSA aufgenommen. Nach erfolgter Sortierung (durchgeführt von C. Linden oder L. Starick) der iNKT Zellpopulation wurden die Zellen pelletiert und wieder in RPMI 1640 Kulturmedium aufgenommen. Die Langzeitkultur erfolgte bei  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in 48 well Flachboden Gewebekulturplatten in RPMI 1640 Kulturmedium mit 10% ConA Überstand in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt

und 100% Luftfeuchtigkeit. Zur Stimulation der kultivierten iNKT Zellen wurden 1:1 mit PBS57 beladenen Dimeren und JJ316 anti-rat CD28 mAb beschichtete pan mIgG Dynabeads<sup>®</sup> (Life technologies) zur Kultur gegeben [102, 103], wobei das Verhältnis Zellen zu Beads 1:5 betrug. Die Zellen wurden alle 7 Tage neu stimuliert, wobei tote Zellen und Beads wie zuvor durch einen Ficollgradienten aus der Kultur entfernt wurden und die Kultur mit frisch beschichteten Beads wie beschrieben neu angesetzt wurde.

#### 2.2.3.12 Fusion von expandierten F344 Milzzellen

Zur Generierung von iNKT Zellhybridomen wurden  $6 \cdot 10^6$  Zellen einer F344 Milzkultur (Tag 20, unsortiert) mit BW5417 Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und in einem 50 ml Falcon Röhrchen bei 1600 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter leichtem Schwenken gelockert. Unter sterilen Bedingungen wurden bei 37°C im Wasserbad unter konstantem Schwenken folgende, auf 37°C vorgewärmte Lösungen in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min zugetropft: 1 ml PEG, 5 ml RPMI 1640 und wiederum 10 ml RPMI 1640. Daraufhin wurden 30 ml RPMI 1640 Kulturmedium langsam über die Innenseite des Röhrchens zu der Zellsuspension laufen gelassen. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend wie zuvor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig durch langsame Zugabe von 5x 5 ml RPMI 1640 Kulturmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in verschiedenen Ansätzen (1:1, 1:10 und 1:100) in 96 well Platten zu je 100  $\mu$ l pro well verteilt und für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde zur Selektion fusionierter Zellen 100  $\mu$ l HAT Medium (2x) pro well zugegeben. Die Platten wurden täglich auf Proliferation von Zellen kontrolliert und Klone vor Überwachsen zur weiteren Kultivierung und Analyse in 24 well Kulturplatten mit frischem RPMI 1640 Kulturmedium transferiert. Positiv auf Dimerbindung getestete Klone wurden zur Generierung von cDNA genutzt.

#### 2.2.3.13 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen

Die Durchflusszytometrie wurde an einem FACSCalibur (BD Biosciences) durchgeführt und mit CellQuest (BD Biosciences) bzw. FlowJo (Tree Star) analysiert. Es wurden  $1 \cdot 10^5$  (bei Transduktanten und expandierten iNKT Zellen) bis  $1 \cdot 10^6$  (bei primären Zellen) Zellen pro Färbung verwendet. Die Färbung erfolgte in FACS Puffer und zwischen Inkubationen wurde mit einem Überschuss an FACS Puffer gewaschen. Bei Färbungen mit CD1d Dimeren oder

unkonjugierten aus der Maus stammenden Antikörpern erfolgte zunächst deren Inkubation und Detektion durch PE konjugierten Esel anti-Maus IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>. Vor Inkubation weiterer Antikörper wurde hierauf mit einem Überschuss an Maus Serum IgG Antikörpern blockiert.

#### **2.2.3.14 Statistische Analyse von Daten**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Prism (GraphPad).

#### **2.2.3.15 Molekulare Modellierungen**

Die molekularen Modellierungen anhand publizierter Proteinstrukturmodelle erfolgte mit Hilfe des PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC)



## 3 Ergebnisse

### 3.1 CD1d Dimere als Hilfsmittel zur Untersuchung von iNKT Zellen

Die eine iNKT Zelle charakterisierende Eigenschaft ist die Bindung des semi invarianten TCR an  $\alpha$ -Galactosylceramid präsentierende CD1d Moleküle [20, 21, 23–25]. Diese liniendefinierende Interaktion kann daher als Mittel zur direkten und spezifischen Detektion von iNKT Zellen genutzt werden. Hierfür werden, aufgrund der erhöheten Avidität und damit Effektivität, oftmals CD1d Oligomere genutzt, die *in vitro* produziert, aufgereinigt und mit Lipidantigenen beladen werden [47, 87, 104]. *In vivo* werden verschiedene Klassen an Hilfsproteinen wie MTP und Saposine, die den Transfer der hydrophoben Glycolipide aus Membranen in die Antigenbindungstasche des CD1d Moleküls ermöglichen, sowie ein erniedrigter pH Wert zur Beladung von CD1d mit Lipidantigenen genutzt [2, 16, 17]. *In vitro* kann die Nutzung von Hilfsproteinen auch durch Zugabe von Detergenzien wie Tween20 oder Triton X-100 ersetzt werden [79, 92].

#### 3.1.1 Generierung humaner CD1d Dimere

Das Prinzip der Generierung und Produktion von MHC-I, -II und CD1d Dimeren, bei denen ein Maus IgG Antikörper als Gerüst zur Dimerisierung der Antigenprasentierenden Moleküle dient [87, 105–107], ist bereits von E. Monzon-Casanova zur Herstellung von Ratten sowie Maus CD1d Dimeren genutzt worden [78, 79]. Analog hierzu erfolgte die Konstruktion und Produktion humaner CD1d Dimere, um die Kreuzreaktivität der iNKT TCR Bindung an CD1d zwischen Vertretern aus Ratte, Maus und Mensch untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurden die extrazellulären  $\alpha_{1-3}$  Domänen des humanen CD1d Moleküls (vgl. Abb. 3.1) mit der Maus IgG schweren Kette des pXIg Vektors fusioniert (vgl. 2.2.1.10).

Nach Produktion und Aufreinigung des neu generierten Konstruktes (vgl. 2.2.2.5), wurde dessen Bindungseigenschaft im Vergleich mit humanen Tetrameren (freundlicherweise zur Ver-

### 3 Ergebnisse

```

Leader | alpha1 Domäne ->
Mensch MGCLLFLLLWALLQAWG SAEVPQRLFPLRCLQISSFANSWTRTDGLAWLGELQTHSWSNDSDTVRS LKPWSQQTFS DQQWETLQHIFRVYRS SFTRD
Maus .RY.PW....F.V.. QS.AQ.KNYTF...M....R.S...SVV...D...R....A.ISFT.....KL.N...K...M.Q...V.....
Ratte .LY.PC.....FP.F.. QS..Q.-NYTF.....R.S...SVV...D...R.....ISFT.....K..N...K...M.Q...T.....

| alpha2 Domäne ->
Mensch VKEFAKMLRL S--YPLELQVSAGCEVHPGNASNNFFHVAFQGKDILSFQGTWEPTQEAPLWVNLAIQVLNQDKWTRETQVWLLNGTQPFVSGLLES
Maus IQ.LV..MSP KED..I.I.L.....MY.....ES.L.....YVVR.W...QTVPG..S.LD.P.K...A.QG.SA...M...D...L..R....A
Ratte I..IV..MSP KED..I.V.L.....MY.....ES.L.....EYVVR.H...QKVP...S.LD.P.KM..A.EG.....I..D.....R....A

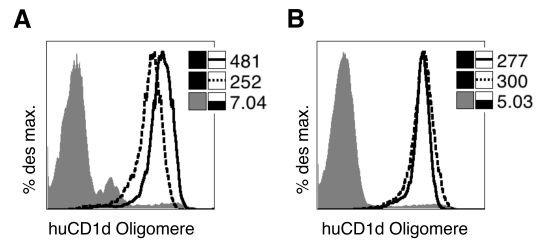
| alpha3 Domäne ->
Mensch GKSELK KQVKPKAWLSRGSPSPGPRLLLVCHVSGFYKPVVWVKWMRGEQEQQGTQPGDILPNADETWYLRATLDVVAGEAAGLSCRVKHSSLEGQDIV
Maus ...D.E..E..V...SV..SAH.HRQ.....M...D...HR..F.....Q.....E...E...A.....G...I
Ratte ..PD.E..E..V.....N.AH.H.Q.....H.....M...D...G..HR.....Q.....E..DE...A.....I....

| TM und ICD
Mensch LYWG GSYTSMGLIALAVLACLFLFLIVGFTSRFKRQTSYQGVL
Maus ...D ARQAPPV..VFI.LIMLVVGA.VYIWR-.RSA..DIR
Ratte ....RQV.V...F.I.GVLVLVGA.AYYIIR..RR...DIM

```

**Abbildung 3.1:** Aminosäuresequenzen der den Dimeren zugrundeliegenden CD1d Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte. TM und ICD: Transmembrane und Intrazelluläre Domäne. Mensch CD1d: GenBank: BC027926.1. Maus CD1d: *CD1d1*, GenBank: AK002582.1. Ratte CD1d: GenBank: AB029486.1.

**Abbildung 3.2:** Humane iNKT TCR Bindung von  $\alpha$ GC beladenen huCD1d Dimeren im Vergleich mit  $\alpha$ GC beladenen huCD1d Tetrameren. (A) Bindung an Jurkat 1369 transduzierte Zelllinie. (B) Bindung an Jurkat 4C12 transduzierte Zelllinie. (A+B) Gestrichelte Linie:  $\alpha$ GC beladene huCD1d Dimere. Durchgehende Linie:  $\alpha$ GC beladenen huCD1d Tetramere. Ausgefüllt: DMSO beladene huCD1d Dimere. Zahlen zeigen geometrischen Mittel der jeweiligen Färbung an



fügung gestellt von S. Gadola) an humanen iNKT TCR mittels Durchflusszytometrie getestet. Hierzu wurden die Dimere mit  $\alpha$ GC beladen oder zur Kontrolle mit DMSO inkubiert (vgl. 2.2.2.6). Die mit humanen iNKT TCR transduzierten Jurkat Zelllinien (Jurkat 4C12, niedrigaffiner TCR und Jurkat 1369, hochaffiner TCR) exprimieren die identische iNKT TCR $\alpha$  Kette (huAV24 93S), unterscheiden sich jedoch im CDR3 $\beta$  ihrer huBV11  $\beta$  Kette und zeigen daher unterschiedliche Affinitäten zu huCD1d [74]. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Gadola. Die generierten huCD1d Dimere zeigten nach Beladung mit  $\alpha$ GC eine deutliche Bindung beider humaner iNKT TCR, die vergleichbar mit der Bindung der humanen  $\alpha$ GC beladenen Tetramere war (vgl. Abb. 3.2).

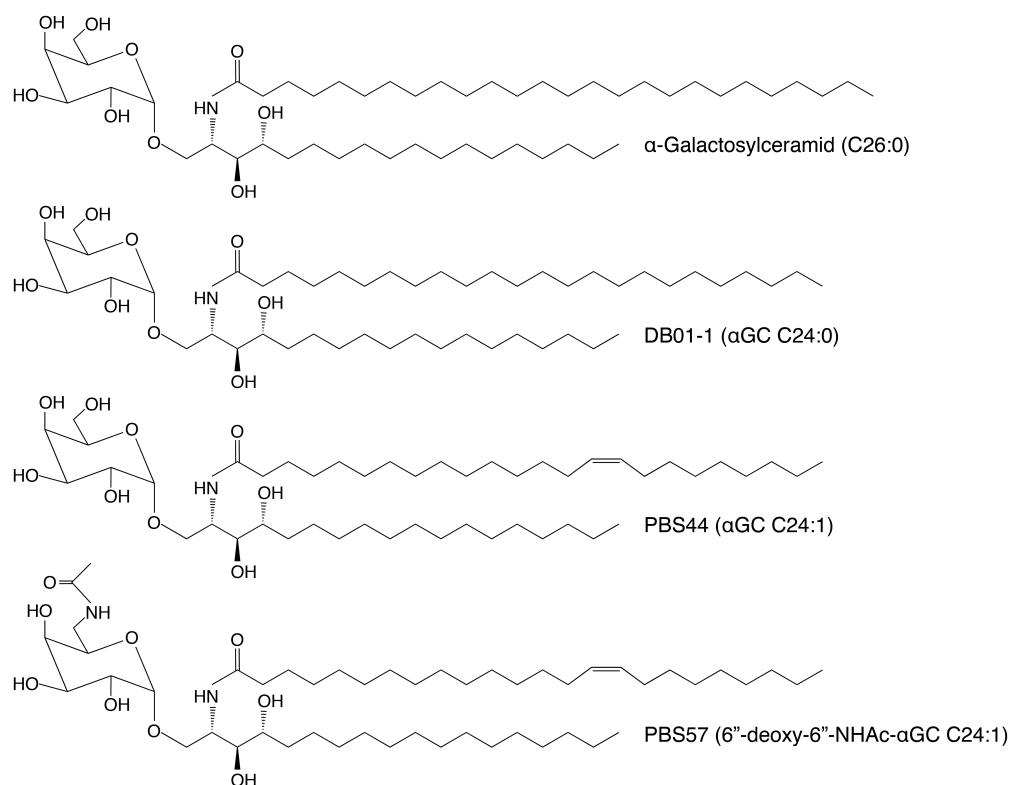
### 3.1.2 Vergleich von Beladungsbedingungen

**Tabelle 3.1:** Übersicht über die verwendeten Detergenzien und deren Eigenschaften. CMC: Kritische Mizellbildungskonzentration. HLB: hydrophilic-lipophilic balance.

Name	Formel	CMC	HLB	Klasse
Triton X-100	$(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$	0,2-0,9 mM	13,5	nichtionisch
Tween20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	0,059 mM	16,7	nichtionisch
Tyloxapol	$(C_{15}H_{21}O(C_2H_4O)_m)_n$ [m=6-8, n<5]	0,018 mM	12-15	nichtionisch

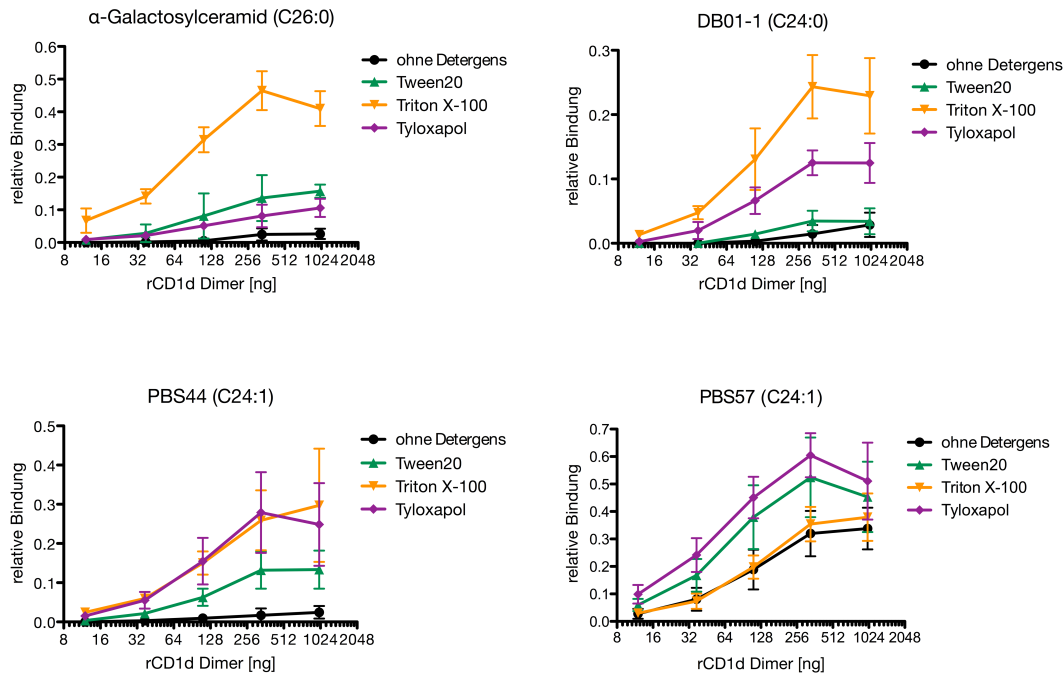
Zum Einsatz von CD1d Dimeren als Hilfsmittel zur spezifischen direkten Färbung des iNKT TCR müssen diese zuvor *in vitro* mit entsprechendem Lipidantigen beladen werden. Als eines der potentesten der bisher charakterisierten Antigene von iNKT Zellen gilt  $\alpha$ GC und dessen Derivate, die sich hinsichtlich Präsentation, sowie Bindung und iNKT Zellaktivierung unterscheiden [91, 92, 108, 109]. Die effektive Beladung von CD1d Dimeren mit  $\alpha$ GC zeigte sich bei früheren Studien abhängig vom Einsatz eines Detergens [79, 92]. Die Beladungseffektivität von  $\alpha$ GC und modifizierter Derivate (vgl. Abb. 3.3) sollte bei Mensch, Maus und Ratten CD1d Dimeren in Abhängigkeit verschiedener, in der Literatur in diesem Zusammenhang beschriebener Detergenzien (jeweils in Endkonzentration von 0,05% vol.) getestet werden [86, 92, 110] (vgl. Tab. 3.1.2). Hierzu wurden diese nach erfolgter Beladung in Titration zur durchflusscy-

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.3:** Struktur von  $\alpha$ -Galactosylceramid (KRN7000) im Vergleich mit dessen Derivaten DB01-1, PBS44 und PBS57. In Klammern angegeben: Länge und Aufbau der Alkylkette anhand Anzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen und Modifikation der Derivate im Vergleich zu  $\alpha$ GC.

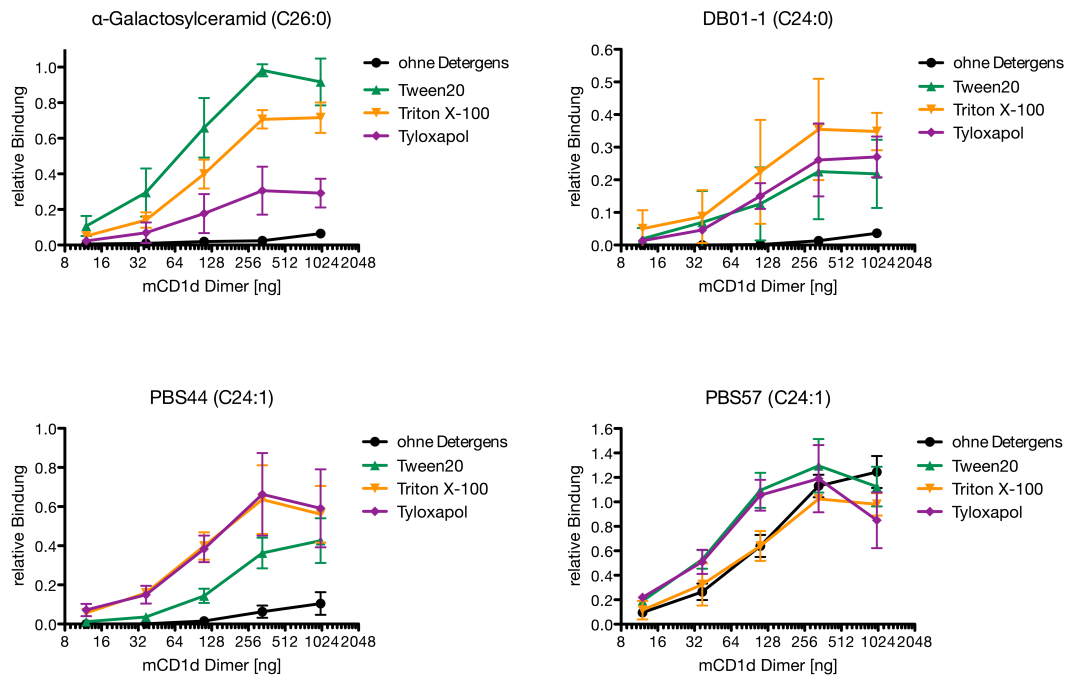
### 3.1 CD1d Dimere als Hilfsmittel zur Untersuchung von iNKT Zellen



**Abbildung 3.4:** Analyse der Beladungseffektivität von rCD1d Dimeren unter verschiedenen Bedingungen. Durchflusszytometrisch anhand der Bindung an einen Maus  $\alpha$ /Ratten  $\beta$  iNKT TCR analysiert. Erhöhung des Geometrischen Mittels der beladenen im Vergleich zu entsprechenden scheinbeladenen Dimeren im Verhältnis zur CD3 Färbung (mAb  $\alpha$ -mCD3 $\epsilon$ ). Skalen angepasst an die verschiedenen Bindungseigenschaften des jeweiligen Antigens. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

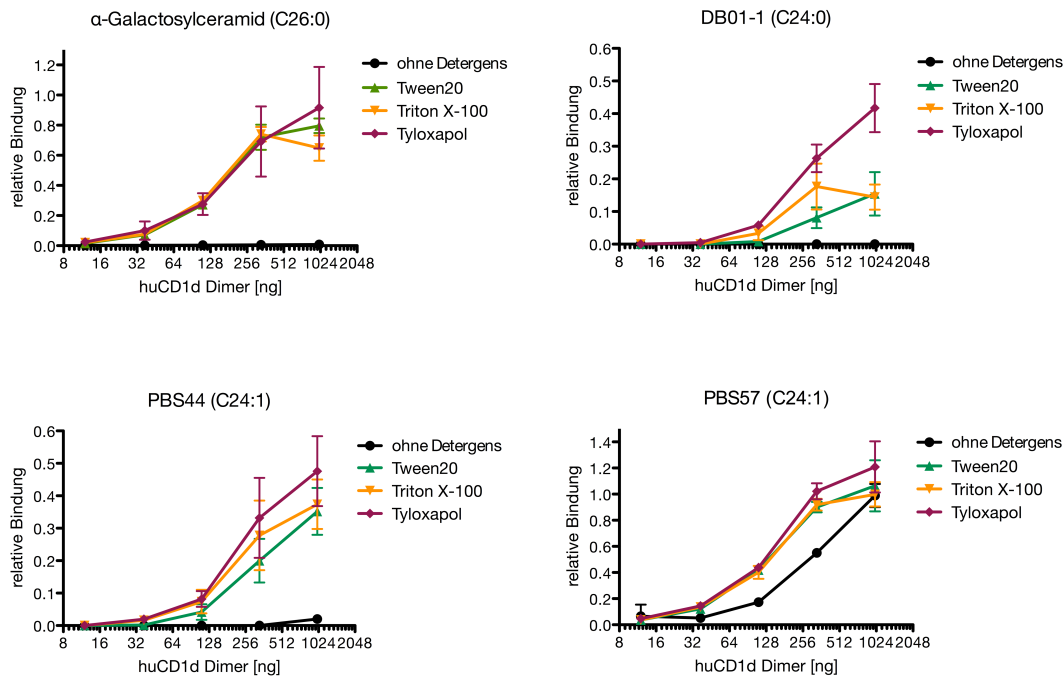
tometrischen Färbung einer iNKT TCR transduzierten Zelllinie verwendet und die Erhöhung der Bindung im Vergleich zur Bindung entsprechender unbeladener Dimere ermittelt. Um die Bindung aller Dimerarten unter identischen Bedingungen zu analysieren, wurde hierbei für alle Färbungen ein Maus/Ratten iNKT TCR verwendet, dessen aus der Maus stammende  $\alpha$  Kette mAV14 93G beinhaltet, die mit der BV8S4-ähnlichen  $\beta$  Kette der Ratte gepaart wurde. Dieser chimäre T Zellrezeptor zeichnet sich durch Bindung von CD1d aller analysierten Spezies aus. Die Bindung eines iNKT TCR hängt stark von der Art des Liganden ab. Dabei spielen sowohl Ursprung des CD1d als auch Struktur des präsentierten Lipidantigens eine entscheidende Rolle. Um die Effektivität verschiedener Beladungsbedingungen unabhängig von Unterschieden in der TCR Expression zu vergleichen, wird die Bindung der Dimere im Folgenden als relativ zu einer parallel durchgeführten CD3 Färbung der transduzierten Zelllinie dargestellt (vgl. Abb. 3.4, 3.5 und 3.6). Die maximalen Bindungswerte aller analysierten Lipide sind in Abb. 3.7 abgebildet.

### 3 Ergebnisse

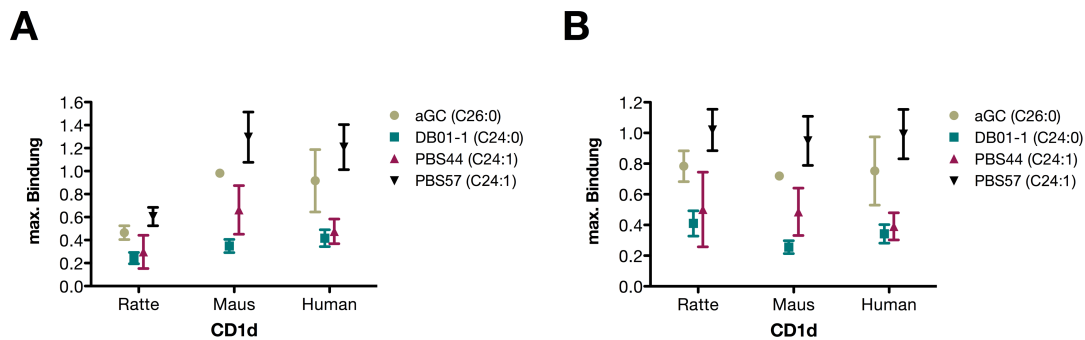


**Abbildung 3.5:** Analyse der Beladungseffektivität von mCD1d Dimeren unter verschiedenen Bedingungen. Durchflusszytometrisch anhand der Bindung an einen Maus  $\alpha$ /Ratten  $\beta$  iNKT TCR analysiert. Erhöhung des Geometrischen Mittels der beladenen im Vergleich zu entsprechenden scheinbeladenen Dimeren im Verhältnis zur CD3 Färbung (mAb  $\alpha$ -mCD3 $\epsilon$ ). Skalen angepasst an die verschiedenen Bindungseigenschaften des jeweiligen Antigens. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

### 3.1 CD1d Dimere als Hilfsmittel zur Untersuchung von iNKT Zellen



**Abbildung 3.6:** Analyse der Beladungseffektivität von huCD1d Dimeren unter verschiedenen Bedingungen. Durchflusszytometrisch anhand der Bindung an einen Maus  $\alpha$ /Ratten  $\beta$  iNKT TCR analysiert. Erhöhung des Geometrischen Mittels der beladenen im Vergleich zu entsprechenden scheinbeladenen Dimeren im Verhältnis zur CD3 Färbung (mAb  $\alpha$ -mCD3 $\epsilon$ ). Skalen angepasst an die verschiedenen Bindungseigenschaften des jeweiligen Antigens. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 3.7:** Maximale Bindung von unterschiedlich beladenen CD1d Dimeren. (A) Dargestellt als Verhältnis der Geometrischen Mittel von Dimerfärbung und CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (B) Wie (A), aber normalisiert auf die höchste Bindung je Spezies.

### 3 Ergebnisse

Die Beladung von Ratten CD1d Dimeren mit  $\alpha$ GC (C26:0) zeigte bei Einsatz von Triton X-100 die höchste Effektivität (vgl. Abb 3.4). Die Bindung der mit Hilfe von Triton X-100 beladenen rCD1d: $\alpha$ GC Dimere war dreifach höher als bei Einsatz von Tween20 oder Tyloxapol. Wurde kein Detergens eingesetzt, konnte keine deutliche Bindung detektiert werden. Auch die Beladung mit DB01-1 (C24:0) war unter Beihilfe von Triton X-100 am wirkungsvollsten, während Tween20, ebenso wie ein Verzicht auf Detergens, nur zu einer minimalen Bindung führte. Jedoch zeigte sich der Einsatz von Tyloxapol für DB01-1 (C24:0) als effektiver als für  $\alpha$ GC (C26:0) (vgl. Abb 3.4). Diese Tendenz setzte sich bei der Beladung mit PBS44 (C24:1) fort, welche mittels Triton X-100 und Tyloxapol nahezu identisch war. Die Bindung der rCD1d:PBS44 Dimere nach Beladung unter Einsatz von Tween20 war wiederum am niedrigsten, jedoch deutlich höher als ohne Einsatz von Detergens, wonach keine Bindung festgestellt werden konnte. Die deutlichste Änderung dieser Hierarchie wurde bei der Beladung von PBS57 (C24:1) beobachtet, welches unter allen Bedingungen effektiv in rCD1d beladen werden konnte und unabhängig von der Anwesenheit eines Detergens während der Beladung zu einer starken Bindung der rCD1d:PBS57 Dimere führte (vgl. Abb 3.4).

Die Beladung von Maus CD1d Dimeren mit  $\alpha$ GC (C26:0), DB01-1 (C24:0) und PBS44 (C24:1) war, ebenso wie bei Ratten CD1d, von der Nutzung eines Detergens abhängig, während PBS57 (C24:1) auch ohne Einsatz von Detergens beladen wurde (vgl. Abb. 3.5). Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede, vor allem in der Effektivität von Tween20. Die Beladung von mCD1d Dimeren mit  $\alpha$ GC (C26:0) war bei Anwesenheit von Tween20 am wirkungsvollsten. Bei Beladung mit DB01-1 (C24:0) zeigte sich Tween20 ähnlich effektiv wie Triton X-100 und Tyloxapol. Hier unterschied sich die Beladung von Maus CD1d deutlich von der Beladung von Ratten CD1d, während die Beladung mit PBS44 (C24:1) bei beiden Spezies ähnliche Bedingungen erforderte (vgl. Abb. 3.5).

Die Notwendigkeit, ein Detergens zur Beladung mit  $\alpha$ GC (C26:0), DB01-1 (C24:0) und PBS44 (C24:1) einzusetzen, konnte auch bei humanen CD1d Dimeren gleichermaßen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.6). Die Beladung mit PBS57 (C24:1) hingegen zeigte sich erneut unabhängig von den getesteten Beladungsbedingungen. Unterschiede zu Ratte und Maus bei der Beladung der detergensabhängigen Lipide wurden in der Präferenz des jeweiligen Detergens gefunden. Die Beladung von huCD1d Dimeren mit  $\alpha$ GC (C26:0) sowie PBS44 (C24:1) war bei allen getesteten Detergenzien nahezu identisch. Zur Beladung von huCD1d mit DB01-1 (C24:0) war Tyloxapol



am effektivsten (vgl. Abb. 3.6).

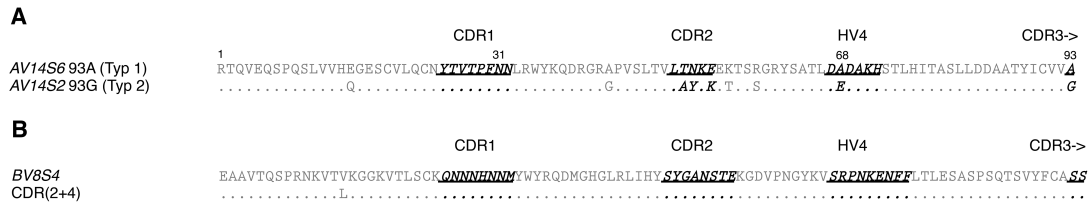
Die maximale Bindung, die für beladene CD1d jeder Spezies erreicht wurde, zeigte sich mit PBS57 am höchsten (vgl. Abb. 3.7A). Insgesamt konnte eine identische Hierarchie der Liganden hinsichtlich der maximalen Bindung beobachtet werden, die unabhängig vom Ursprung des präsentierenden CD1d war: PBS57 (C24:1) >  $\alpha$ GC (C26:0) > PBS44 (C24:1) > DB01-1 (C24:0). Die statistische Auswertung dieser, teilweise unter verschiedenen Bedingungen erreichten, maximalen Bindungen zeigte bei allen CD1d Molekülen eine signifikant höhere Bindung von  $\alpha$ GC (C26:0) im Vergleich mit DB01-1 (C24:0), bzw. von PBS57 (C24:1) im Vergleich mit PBS44 (C24:1) sowie DB01-1 (C24:0) (vgl. Tab. 3.2, Seite 72; Tab. 3.3, Seite 72 und Tab. 3.4, Seite 73). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen PBS57 (C24:1) und  $\alpha$ GC (C26:0) bzw. zwischen  $\alpha$ GC (C26:0) oder DB01-1 (C24:0) und PBS44 (C24:1) gefunden. Nach Bereinigung der allgemeinen, vom Liganden unabhängigen Bindungsunterschiede der verschiedenen CD1d Moleküle, zeigte sich bei CD1d aller Spezies eine vergleichbare vom präsentierten Lipid abhängige maximale Bindung (vgl. Abb. 3.7B).

## 3.2 *In vitro* CD1d Dimerbindungsstudien

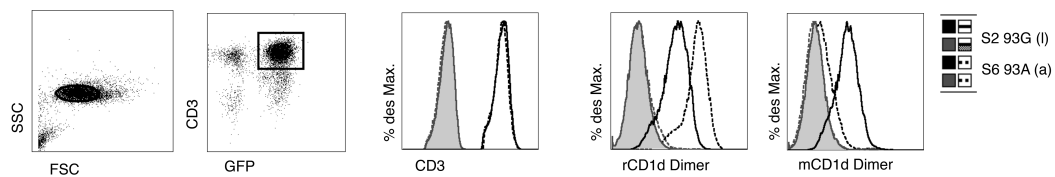
Ratten besitzen bis zu zehn verschiedene *AV14* Gensegmente, die homolog dem in Maus iNKT Zellen genutzten *AV14* der invarianten  $\alpha$  Kette sind und anhand ihrer CDR2 $\alpha$  Sequenz in Typ 1 oder Typ 2 eingeteilt werden [83, 84]. Zur Untersuchung der Funktionalität von Typ 1 und Typ 2 *AV14* Gensegmenten hinsichtlich der CD1d Bindung wurden zwei  $\alpha$  Ketten mit unterschiedlichen *AV14* Gensegmenten (AV14S6 bzw. AV14S2) zusammen mit einer bereits charakterisierten  $\beta$  Kette (CDR(2+4), ähnlich BV8S4) in einem TCR negativen T Zellhybridom (BW r/mCD28) exprimiert [69]. Beide  $\alpha$  Ketten weisen die charakteristischen Unterschiede zwischen Typ 1 und Typ 2 *AV14* Gensegmenten auf und unterscheiden sich zusätzlich an Position 93, der V-J Umlagerung zu Beginn des CDR3 $\alpha$  (vgl. Abb. 3.8A). Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der *rAV14* Gensegmente richtet sich nach [78], falls zusätzlich angegeben: abweichende ursprüngliche Nomenklatur nach [111].

Beide generierten Zelllinien wiesen eine ähnliche Oberflächenexpression des TCR auf, angezeigt durch Färbung des an der Oberfläche nur innerhalb des TCR Komplexes vorhandenen CD3 Moleküls (vgl. Abb. 3.9). Zur Analyse der CD1d Bindungseigenschaften beider TCR wurden mit  $\alpha$ GC beladene Ratten sowie Maus CD1d Dimere benutzt. Während der AV14S6 93A

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.8:** Aminosäuresequenzen der den Untersuchungen zugrundeliegenden Ratten iNKT TCR Ketten. (A) Aminosäuresequenzunterschiede der AV14 Gensegmente. AV14S6 (ehemals AV14S1, GenBank DQ340293), AV14S2 (ehemals AV14S3, GenBank AB036696.1) Fett: CDRs. (B) Aminosäuresequenz von CDR(2+4) im Vergleich mit BV8S4. Fett: CDRs



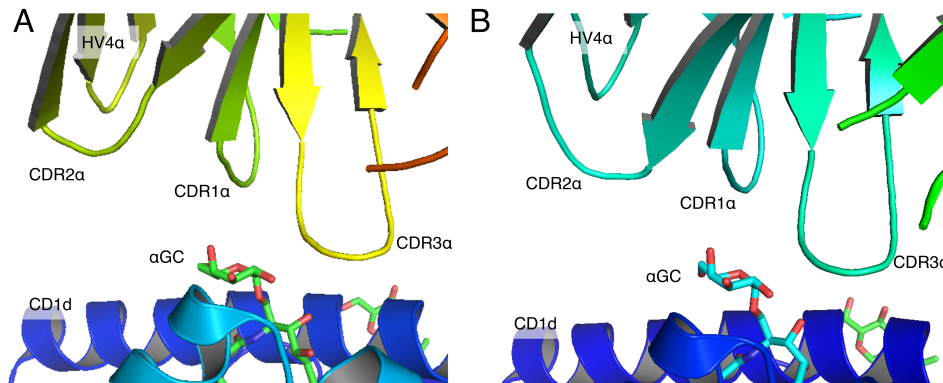
**Abbildung 3.9:** CD1d Bindungseigenschaften der mit Ratten iNKT TCR transduzierten Zelllinien. Vorausgeselektiert auf CD3 positive Zellen. Gestrichelte Linie: AV14S6 93A iNKT TCR. Durchgehende Linie: AV14S2 93G TCR. Beide: Gepaart mit CDR(2+4)  $\beta$  Kette. Ausgefüllt: Isotypkontrolle und unbeladene Dimerfärbung. GFP Expression: Durch Plasmid der  $\alpha$  Kette codiert.

TCR eine starke Bindung an rCD1d Dimere zeigte, konnte kaum Bindung von mCD1d Dimeren festgestellt werden. Dies entspricht der fehlenden Spezieskreuzreaktivität, die für den Ratten iNKT TCR bereits zuvor gezeigt wurde [69, 78]. Im Gegensatz hierzu konnte der AV14S2 93G TCR gleichermaßen mit Ratten und Maus CD1d Dimeren gefärbt werden, zeigte jedoch im Vergleich eine verringerte Ratten CD1d Dimerbindung (vgl. Abb. 3.9).

Zur genauen Ermittlung der diesen Bindungsunterschieden zugrunde liegenden Aminosäuresequenzunterschiede wurden auf Grundlage der ursprünglich untersuchten  $\alpha$  Ketten mittels spezifischer Mutagenese abgewandelte Versionen erstellt, die sich in CDR2 $\alpha$ , Position 68 und Position 93 unterschieden (vgl. Abb. 3.10). Diese wurden zusammen mit der BV8S4-ähnlichen CDR(2+4)  $\beta$  Kette exprimiert und hinsichtlich ihrer CD1d Dimerbindung analysiert. Zur Validierung erfolgte die Analyse mindestens dreimal in unabhängiger Form. Um mögliche Schwankungen der TCR Oberflächenexpression zu berücksichtigen, wurde jeweils das Verhältnis zwischen Dimerbindung und CD3 Oberflächenfärbung berechnet und das Verhältnis als willkürliche Einheiten relativ zu einer konstanten Referenzfärbung dargestellt, die bei jedem Experiment parallel durchgeführt wurde. Die Positionierung der in dieser Arbeit im iNKT TCR $\alpha$  der Ratte untersuchten Regionen ist in Abb. 3.11 im Modell der entsprechenden iNKT TCR Interaktionen

			CDR1	CDR2	HV4	CDR3->
			1	31	68	93
			RTQVEQSPQSLVVHEGESCVLQCN	<b>YVVTPEW</b> LRWYKQDRGRAPVSLT	<b>LTKK</b> EKTSRGRYSATL	<b>DADAKH</b> STLHITASLLDDAATYICVV
	(a) S6	93A	.....	.....	.....	.....
	(b) S6	93G	.....	.....	.....	.....
	(c) S6	93S	.....	.....	.....	.....
	(d) S6	93V	.....	.....	.....	.....
	(e) S6 T1->2	93A	.....	.....	.....	.....
	(f) S6 T1->2++	93A	.....	.....	.....	.....
	(g) S6 T1->2++ A68E	93A	.....	.....	.....	.....
	(h) S6 A68E	93A	.....	.....	.....	.....
	(i) S8	93A	K.....Q.....	.....	K.....	.....
	(j) S8	93V	K.....Q.....	.....	K.....	.....
	(k) S2	93A	.....	.....	.....	.....
	(l) S2	93G	.....	.....	.....	.....
	(m) S2 T2->1	93A	.....	.....	.....	.....
	(n) S2	E68A 93A	.....	.....	.....	.....

**Abbildung 3.10:** Aminosäuresequenzen der zur Analyse verwendeten mutierten Ratten iNKT TCR  $\alpha$  Ketten. Fett: CDRs.



**Abbildung 3.11:** Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d: $\alpha$ GC in (A) Maus und (B) Mensch nach (A) PDB 3HE6 [71] und (B) PDB 2PO6 [67] als Übersicht der TCR $\alpha$  Positionierung.

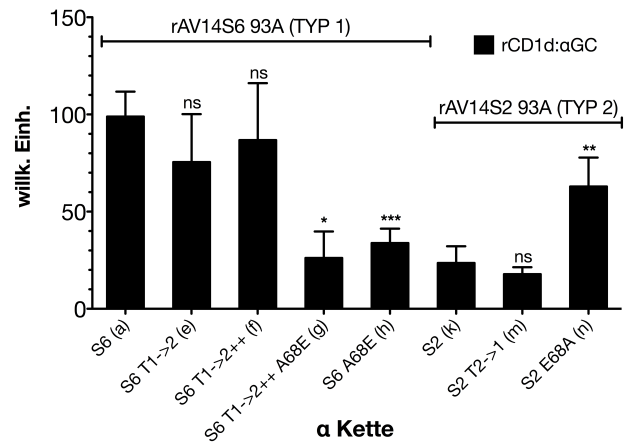
von Maus und Mensch dargestellt.

### 3.2.1 Untersuchung des CDR2 $\alpha$ und HV4 $\alpha$

Die zu deren Gruppierung herangezogene CDR2 $\alpha$  Region unterscheidet sich wesentlich zwischen Typ 1 und Typ 2 *AV14* Gensegmenten der Ratte [84]. Bindungsstudien mit iNKT Zellrezeptoren aus Mensch und Maus deuten jedoch auf keine oder nur geringe Bedeutung des CDR2 $\alpha$  auf die Ligandbindung hin [67, 71, 112, 113]. Um den Einfluss dieser in der Ratte variablen Region hinsichtlich der Bindungsunterschiede von AV14S6 und AV14S2 zu untersuchen, wurden die entsprechenden Aminosäuren zwischen beiden *AV14* Gensegmenten ausgetauscht (vgl. Abb. 3.10). Die Mutagenese des CDR2 $\alpha$  führte in beiden Fällen (AV14S6 T1 $\rightarrow$ 2 und AV14S2 T2 $\rightarrow$ 1) zu keiner Veränderung der Dimerbindung, verglichen mit den zugrundeliegenden Ursprungsrezeptoren (vgl. Abb. 3.12 und Tab. 3.5). Auch die zusätzliche Mutation der Positionen 56 und 59, im Bereich zwischen CDR2 $\alpha$  und HV4 $\alpha$  (AV14S6 T1 $\rightarrow$ 2++), hatte keinen Einfluss

### 3 Ergebnisse

**Abbildung 3.12:** Einfluss des HV4 $\alpha$  im Ratten iNKT TCR auf die rCD1d Dimerbindung mit (mutierten) Ratten AV14 TCR $\alpha$  Ketten und CDR(2+4) transduzierter Zelllinien. Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als willkürliche Einheiten der Dimerbindung im Verhältnis zu CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , ungepaarter t-Test.

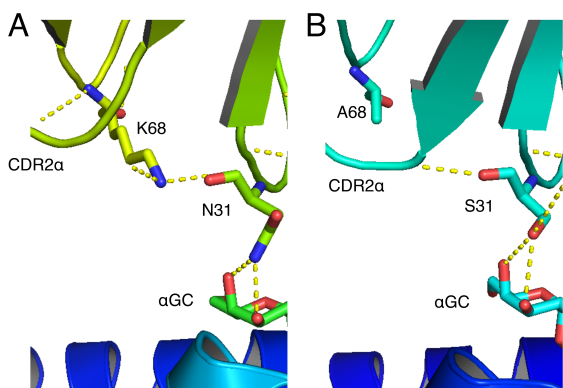


auf die rCD1d Dimerbindung. Erst der zusätzliche Austausch der Position 68 im HV4 $\alpha$  von Alanin zu Glutaminsäure (AV14S6 T1→2++ A68E) zeigte eine signifikante Auswirkung auf die Ligandbindung des entsprechenden TCR, welche vergleichbar mit der des Typ 2 AV14S2 war. Um zu testen, ob die rCD1d Bindungsunterschiede zwischen AV14S6 und AV14S2 allein auf Position 68 beruhen, wurden diese bei beiden AV14 Gensegmente ausgetauscht (AV14S6 A68E und AV14S2 E68A). AV14S6 A68E zeigte eine signifikant niedrigere rCD1d Dimerbindung, vergleichbar mit AV14S2 und AV14S6 T1→2++ A68E. Umgekehrt zeigte AV14S2 E68A eine signifikante Erhöhung der rCD1d Bindung.

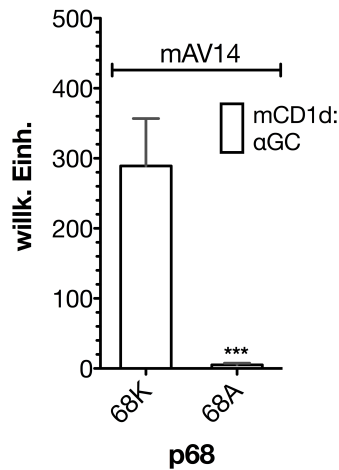
Ein Modell der Ligandinteraktion des Ratten iNKT TCR ist bisher nicht vorhanden. Da jedoch entsprechende Modelle für die Maus und Mensch iNKT TCR Interaktion mit CD1d: $\alpha$ GC existieren, die einen tieferen Einblick in die Rolle des HV4 $\alpha$  während der Ligandbindung erlauben, wurde auch die Auswirkung einer Mutation von Position 68 in diesen Spezies analysiert. Die zur Analyse verwendeten  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten sind in Abb. 3.13 dargestellt. Proteinmodellierungen der Interaktionen von Aminosäure 68 anhand bereits veröffentlichter Kristallstrukturen der iNKT TCR Interaktion beider Spezies, sind in Abb. 3.14 dargestellt. In der Maus befindet sich an der entsprechenden Position im HV4 $\alpha$  ein Lysin, im Menschen Alanin. Um Auswirkungen auf die jeweilige Dimerbindung zu analysieren, wurde in Maus K68 zu Alanin ausgetauscht, im Menschen A68 zu Glutaminsäure, wie sie auch in einigen Ratten AV14 Gensegmenten zu finden ist. Alle  $\alpha$  Ketten wurden zusammen mit einer für die jeweilige Spezies typischen  $\beta$  Kette exprimiert (Maus: BV8S2, Mensch: BV11). Während huAV24 A68E keine Veränderung der Ligandinteraktion zeigte (Daten nicht gezeigt), kam es bei mAV14 K68A zu einen signifi-

	CDR1	CDR2	HV4	CDR3->
<b>A</b>				
mAV14	1 KTQVEQSPQSLVVRQGENCVLQCN <sup>31</sup> <u>YSVTPDNHL</u> LRWFKQDTGKGLVSLTV <u>LVDQK</u> DKTSNGRYSATI <sup>68</sup> <u>DKDAKH</u> STLHITATLLDDTATYICVV <sup>93</sup> <u>G</u>			
mAV14 K68A			<u>A</u>	
mAV14 G93A				<u>A</u>
<b>B</b>				
mBV8S2	EAAVTQSPRNKVAVKGGKVTLSCN <u>QTNVHNNM</u> YWRQDTGHGLRLIHV <u>SYGAGSTF</u> KGDIPDGYKA <u>SRPSQENES</u> LILELATPFSQTSVYFCA <u>SS</u>			
<b>C</b>				
huAV24	1 KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCN <sup>31</sup> <u>YTVSPFSN</u> LRWYKQDTGRGPVSLTI <u>MTESF</u> NTKSNGRYTATI <sup>68</sup> <u>DADTKQ</u> SSLHITASQLSDSASYICVV <sup>93</sup> <u>S</u>			
huAV24 A68E			<u>E</u>	
huAV24 S93G				<u>G</u>
<b>D</b>				
huBV11	EADIYQTPRYLVIGTGKKITLECS <u>QTMGHDKM</u> YWYQQDPGMELHLIHV <u>SYGVNSTF</u> KGDLSSSESTV <u>SRIRTEHEP</u> LTLLESARPSHTSQYLCA <u>SS</u>			

**Abbildung 3.13:** Aminosäuresequenzen der den Untersuchungen zugrundeliegenden Maus und Mensch iNKT TCR Ketten. (A) Aminosäuresequenzunterschiede der verwendeten mAV14 Gensegmente (GenBank DQ340292). (B) Aminosäuresequenz des mBV8S2 Gensegments (GenBank DQ340294). (C) Aminosäuresequenzunterschiede der huAV24 Gensegmente (GenBank DQ097904.1). (D) Aminosäuresequenz des verwendeten huBV11 Gensegments (GenBank DQ340293)



**Abbildung 3.14:** Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d:αGC in (A) Maus und (B) Mensch nach (A) PDB 3HE6 [71] und (B) PDB 2PO6 [67] mit Fokus auf Interaktionen ausgehend von (A) Lysin 68 und Asparagin 31 im Maus iNKT TCR, sowie (B) Alanin 68 und Serin 31 im humanen iNKT TCR.

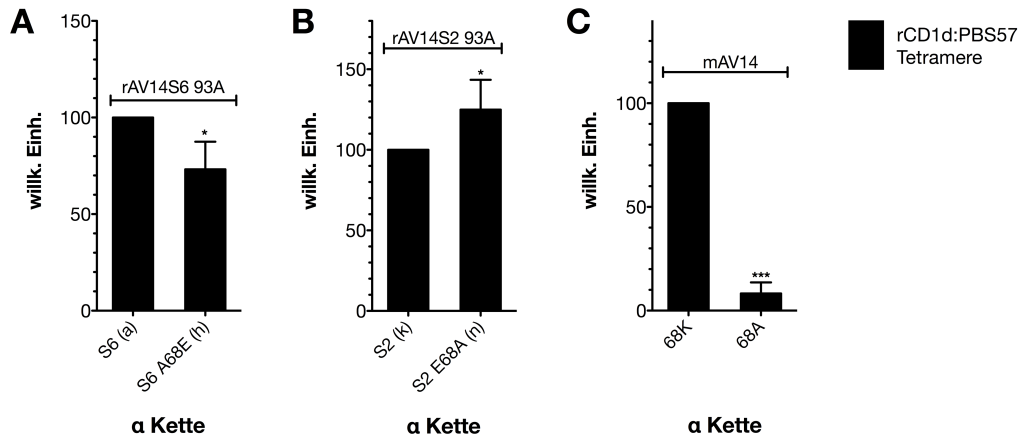


**Abbildung 3.15:** Einfluss des HV4 $\alpha$  im Maus iNKT TCR auf die mCD1d Dimerbindung mit (mutierten) Maus AV14 TCR $\alpha$  Ketten und BV8S2 TCR $\beta$  Kette transduzierter Zelllinien. Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als willkürliche Einheiten der Dimerbindung im Verhältnis zu CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , ungepaarter t-Test.

kanten Verlust der CD1d Dimerbindung (vgl. Abb. 3.15). Dieser ist auch bei der Interaktion mit rCD1d:PBS57 Tetrameren stark ausgeprägt (vgl. Abb. 3.16C), wohingegen der Einfluss von Position 68 in der Ratte sowohl bei rAV14S6 als auch bei rAV14S2 auf die rCD1d:PBS57 Tetramerbindung deutlich geringer ausgeprägt ist, als bei Einsatz von Dimeren (vgl. Abb. 3.16A+B).

### 3.2.2 Untersuchung des V-J Übergangs

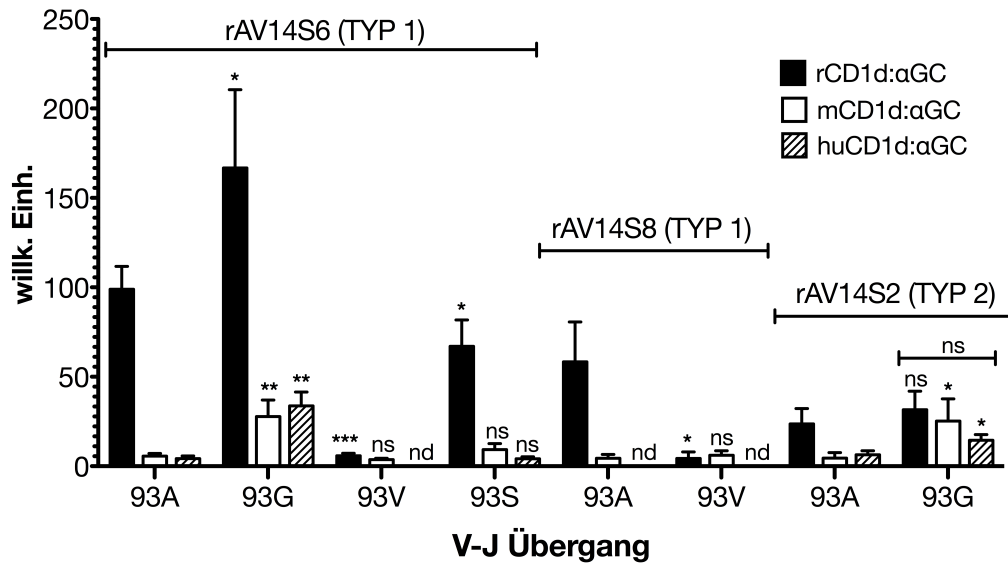
Frühere Untersuchungen der AV14/AJ18 Umlagerungen in der Ratte zeigten eine hohe Frequenz nicht kanonischer iNKT TCR $\alpha$  Kettensequenzen, die, an Stelle des keimbahncodierten Alanins, Glycin an Position 93 enthielten [78, 111]. Dies entspricht der in der Maus iNKT TCR $\alpha$  Kette keimbahncodierten Aminosäure [21, 26]. Der indirekte Einfluss natürlich vorkommender Variationen des AV24/AJ18 Übergangs im iNKT TCR $\alpha$  des Menschen auf die CD1d Interaktion war zuvor bereits gezeigt worden [75]. Da in der Ratte diese Variationen zudem iNKT spezifisch in hoher Frequenz aufzutreten scheinen (vgl. Abschnitt 3.3.2 und Abb. 3.25), wurde die Auswirkung dieses Austauschs auf die Ligandbindung des iNKT TCR der Ratte *in vitro* untersucht. Zusätzlich zu den am häufigsten an dieser Position auftretenden Aminosäuren Alanin und Glycin wurde auch der Austausch zu Valin, das in einer Ratten IHL AV14S8 (Typ 1)  $\alpha$  Kette an Position 93 gefunden wurde [69], und Serin, keimbahncodiert an Position 93 $\alpha$



**Abbildung 3.16:** Einfluss des HV4 $\alpha$  iNKT TCR auf die rCD1d Tetramerbindung mit (mutierten) Ratten bzw. Maus iNKT TCR transduzierter Zelllinien. Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als Veränderung der Tetramerbindung der jeweiligen mutierten TCR im Vergleich zur wildtypischen Variante. Ausgewertet als Verhältnis zwischen Dimerbindung und CD3 Oberflächenfärbung und als willkürliche Einheiten relativ zur Färbung des jeweiligen wildtypischen TCR dargestellt. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , gepaarter t-Test.

des menschlichen iNKT TCR [21, 26], untersucht (vgl. Abb. 3.17).

Die in primären *AV14/AJ18* Umlagerungen der Ratte hochfrequent auftretende Substitution A93G zeigte für *AV14S6 93G* eine signifikante Verbesserung der rCD1d Dimerbindung im Vergleich zu *AV14S6 93A* (vgl. Abb. 3.17). Bei *AV14S2 93G* trat nur eine tendenzelle Verbesserung im Vergleich mit *AV14S2 93A* auf. Erstaunlicherweise ermöglichte jedoch in beiden *AV14* Segmenten Glycin an Position 93 die Bindung sowohl von mCD1d als auch huCD1d Dimeren. Diese deutliche Auswirkung der A93G Substitution im *AV14S6* der Ratte auf die CD1d Dimerbindung spiegelte sich auch in der TCR abhängigen Aktivierung der jeweiligen transduzierten Zelllinie wider (vgl. Abb. 3.18A). Hier beeinflusste die Nutzung von 93G im Vergleich zu 93A speziell die Aktivierung des Ratten iNKT TCR durch CD1d:PBS57 aus Maus und Mensch. Dies zeigt sich an der erhöhten IL-2 Antwort *AV14S6 93G* exprimierender Zellen bei Inkubation mit immobilisierten CD1d:PBS57 Dimeren und anti-CD28 mAb (JJ319). Bei Nutzung von 93G im Vergleich zu 93A, konnte für CD1d Dimere aus Maus und Mensch ein halbmaximaler Effekt bereits bei einer drei- bis vierfach niedrigeren Konzentration erreicht werden. Die Nutzung des im menschlichen iNKT TCR präsenten Serins an Position 93 führte hingegen bei *AV14S6* zu keiner signifikanten Erhöhung der Spezieskreuzreaktivität (vgl. Abb. 3.17), während die rCD1d Dimerbindung in reduzierter Form erhalten blieb. Der Austausch A93V im Typ 1

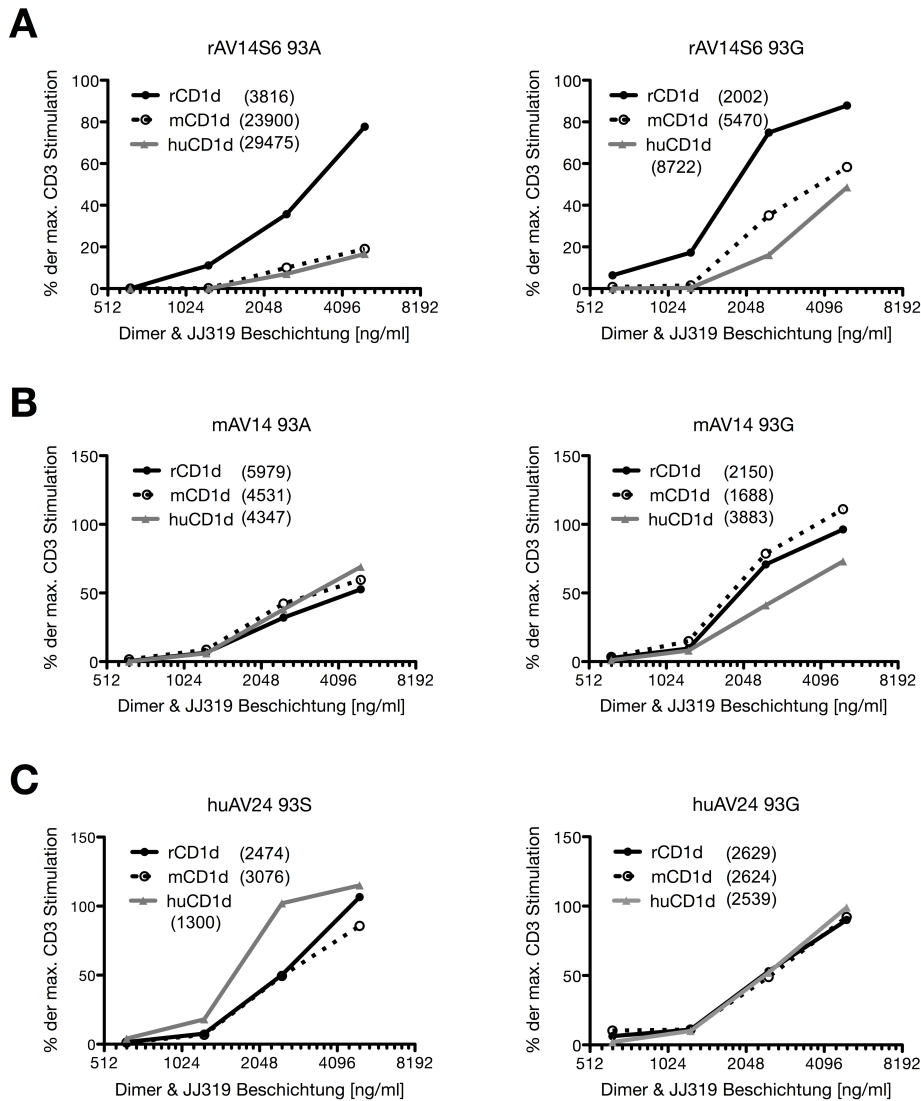


**Abbildung 3.17:** Einfluss des V-J Übergangs der  $\alpha$  Kette im Ratten iNKT TCR auf die CD1d Dimerbindung mit (mutierten) Ratten AV14 TCR $\alpha$  Ketten und CDR(2+4) transduzierter Zelllinien. Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als willkürliche Einheiten der Dimerbindung im Verhältnis zu CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , ungepaarter t-Test, nd: nicht durchgeführt

AV14S6 Segment bewirkte einen Verlust der rCD1d Dimerbindung, wie es auch bei AV14S8 93V in früheren Untersuchungen beobachtet wurde [69]. Diesem Befund entsprechend bewirkte der gegenläufige Austausch des bei AV14S8 gefundenen Valins an Position 93 zu Alanin eine signifikant verbesserte rCD1d Dimerbindung.

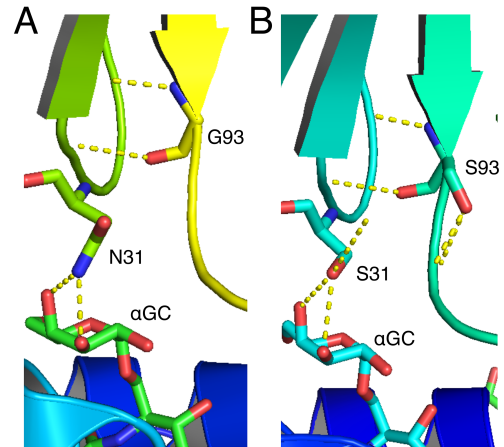
Modellierungen der Interaktionen von Position 93 am Beginn des CDR3 $\alpha$  von Maus und Mensch zeigten keine direkte Bindung des Liganden (vgl. Abb. 3.19). Natürlich auftretende Abweichungen von der kanonischen AV14/AJ18 Umlagerung an Position 93, dem Beginn des CDR3 $\alpha$ , wurden in der Maus mehrfach beschrieben [21, 26, 69, 114–116]. Jedoch wurde bisher nur der Einfluss von Position 94 bis Position 99 des CDR3 $\alpha$  auf die CD1d Bindung des iNKT TCR der Maus untersucht [46, 68]. Der signifikante Einfluss von Position 93 konnte in dieser Arbeit auch für die CD1d Bindung des Maus iNKT TCR durch eine G93A Substitution bestätigt werden (vgl. Abb. 3.20) und wirkt sich auch auf die TCR abhängige Aktivierung der jeweiligen transduzierten Zelllinie aus (vgl. Abb. 3.18B). Für den menschlichen iNKT TCR wurde ebenso eine reduzierte Ligandenbindung bei natürlich auftretenden Varianten (Threonin, Asparagin oder Isoleucin) der V-J Umlagerung in der TCR $\alpha$  Kette beschrieben [75]. Die Analyse des humanen iNKT TCR mit S93G Substitution, welche nicht natürlich vorkommt, zeigte die



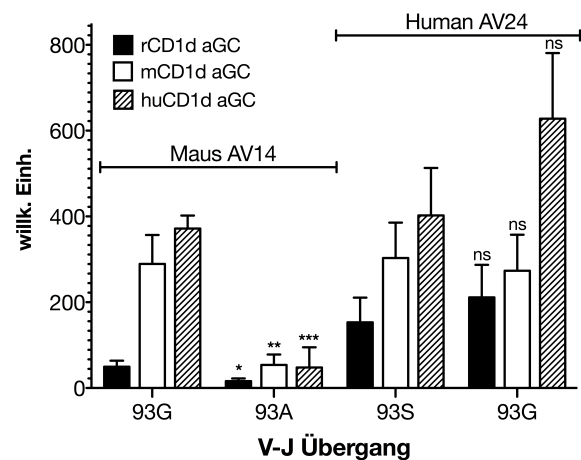


**Abbildung 3.18:** Einfluss des V-J Übergangs auf die CD1d abhängige Aktivierung des iNKT TCR von Ratte, Maus und Mensch. Vergleich der IL-2 Antwort mit (A) Ratten iNKT TCR, (B) Maus iNKT TCR, (C) Mensch iNKT TCR transduzierter Zelllinien, anteilig der maximal erreichten CD3 abhängigen Stimulation ( $5 \mu\text{g/ml}$  +  $5 \mu\text{g/ml}$  JJ319) der jeweiligen Zelllinie. Zellen wurden für 24 h in Gegenwart immobilisierter PBS57 beladener Dimere + JJ319 (anti-rCD28 mAb) angegebener Konzentration inkubiert. Ein Versuch, in Duplikaten durchgeführt. In Klammern angegeben: EC50 [ng/ml]

**Abbildung 3.19:** Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d:αGC in (A) Maus und (B) Mensch nach (A) PDB 3HE6 [71] und (B) PDB 2PO6 [67] mit Fokus auf Interaktionen ausgehend von (A) Glycin 93 und Asparagin 31 im Maus iNKT TCR, sowie (B) Serin 93 und Serin 31 im humanen iNKT TCR.



**Abbildung 3.20:** Einfluss des V-J Übergangs der α Kette im iNKT TCR von Maus und Mensch auf die CD1d Dimerbindung mit (mutierten) Maus oder Mensch iNKT TCRα und β Ketten transduzierter Zelllinien (Maus: AV14 und BV8S2, Mensch: AV24 und BV11 (vgl. Abb. 3.13). Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als willkürliche Einheiten der Dimerbindung im Verhältnis zu CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , ungepaarter t-Test



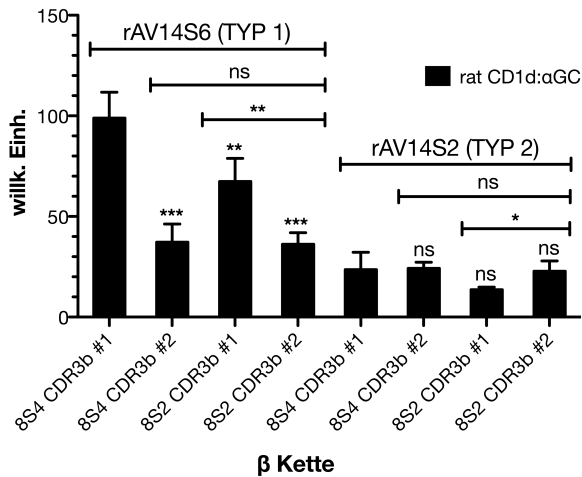
Bewahrung der Funktionalität mit tendenziell erhöhter Dimerbindung (vgl. Abb. 3.20), jedoch war diese Änderung nicht signifikant. Ebenso konnte keine deutliche Verbesserung der TCR abhängigen Aktivierung durch mCD1d und rCD1d festgestellt werden (vgl. Abb. 3.18C).

### 3.2.3 Untersuchung der β Kette

Neben der dominanten Rolle der α Kette während der Ligandeninteraktion wurde auch der Einfluss unterschiedlicher BV Segmentnutzung auf Selektion im Thymus und spätere Bindun-

	CDR1	CDR2	HV4	CDR3	
BV8S4 CDR3b#1	EAAVTQSPRNKVTLLKGGKVTLSCK	QNNHNNMYYWRQDMGHGLRLIHY	SYGANSTK	RGDVPNGYKVSRPNKENFLLTLESASPSQTSVYFCA	SSDSGNVLY
BV8S4 CDR3b#2	.....	.....	.....	.....	LTERLF
BV8S2 CDR3b#1	.....	.....	.....	.....	.....
BV8S2 CDR3b#2	.....S.....V.....	.....DV.....	.....D.....	.....SQGD.....	.....LTERLF

**Abbildung 3.21:** Aminosäuresequenzunterschiede der analysierten iNKT TCRβ Ketten der Ratte. BV8S2 CDR3β #1: GenBank AY228549



**Abbildung 3.22:** Einfluss der iNKT TCR $\beta$  Kette in der Ratte auf die rCD1d Dimerbindung mit unterschiedlichen Ratten iNKT TCR $\alpha$  und  $\beta$  Ketten transduzierter Zelllinien (vgl. Abb. 3.21). Färbungen wurden mindestens dreifach unabhängig durchgeführt. Dargestellt als willkürliche Einheiten der Dimerbindung im Verhältnis zu CD3 Färbung. Gegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , ungepaarter t-Test

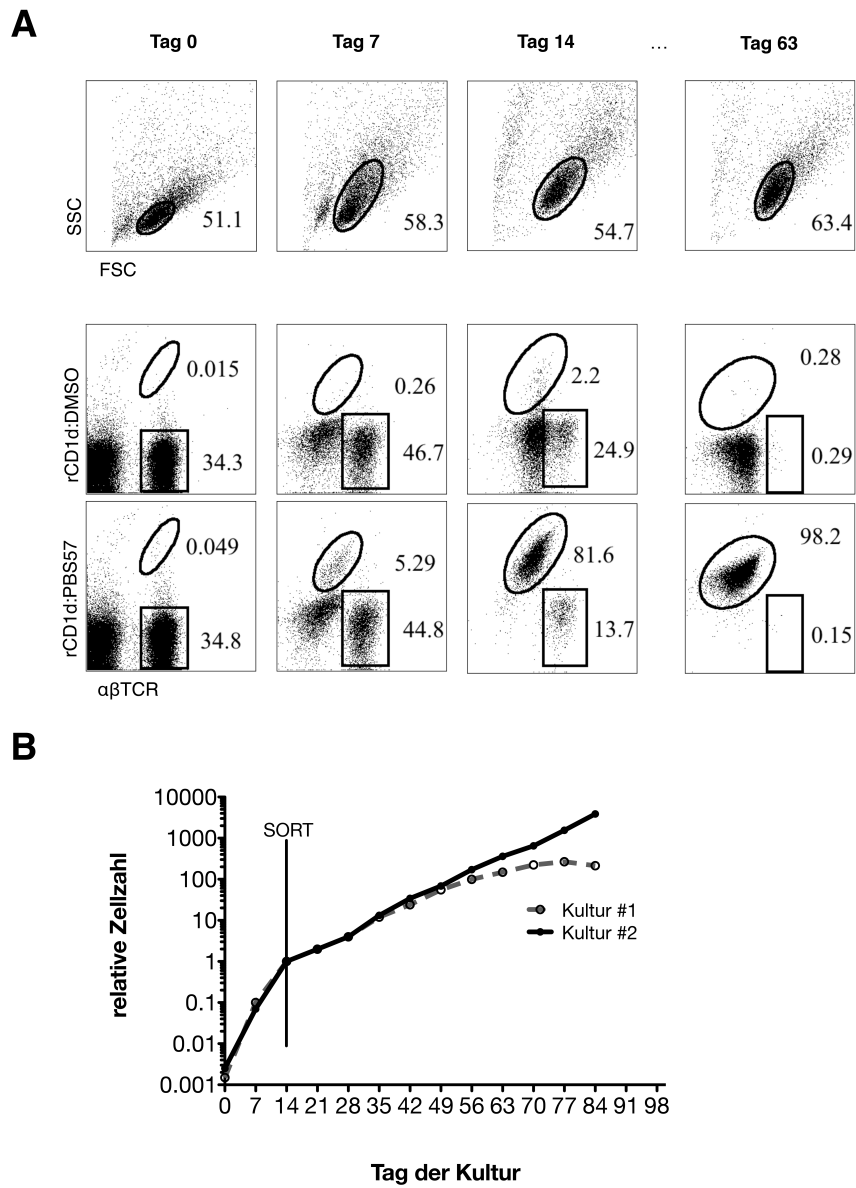
geigenschaften beschrieben [71, 117, 118]. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass die CD1d Bindung bei schwächeren Antigenen durch CDR3 $\beta$  moduliert werden kann [70, 119]. Um den Einfluss beider Bereiche der  $\beta$  Kette in der Ratte unabhängig voneinander zu untersuchen, wurden zwei dem *BV8S2* der Maus homologe, sich jedoch in CDR2 $\beta$  und HV4 $\beta$  unterscheidende *BV* Segmente genutzt (*BV8S4* sowie *BV8S2*) und mit zwei verschiedenen CDR3 $\beta$  Umlagerungen kombiniert (#1 und #2) (vgl. Abb. 3.21). Deren Auswirkung auf die Bindungseigenschaften des Ratten iNKT TCR in Kombination mit CDR3 $\beta$  #1 und gepaart mit AV14S6 (ehemals AV14S1) wurde bereits charakterisiert [69]. Die verringerte Bindung von AV14S6 gepaart mit BV8S2, verglichen mit BV8S4 bei identischer VDJ Umlagerung und somit identischem CDR3 $\beta$ , konnte hier auch für rCD1d Dimere bestätigt werden, wohingegen dieser Effekt bei einer Paarung mit AV14S2 (Typ 2) schwächer ausfiel (vgl. Abb. 3.22 und Tab. 3.6). Allerdings zeigte sich der Unterschied zwischen BV8S4 und BV8S2 nur in Umlagerung mit CDR3 $\beta$  #1. In Umlagerung mit CDR3 $\beta$  #2 konnte weder in Paarung mit rAV14S2 noch in Paarung mit rAV14S6 ein Unterschied in der rCD1d Bindung beider *BV* Segmente festgestellt werden. Zusätzlich konnte jedoch ein signifikanter Einfluss des CDR3 $\beta$  auf die Bindung von CD1d beobachtet werden. Interessanterweise erwies sich die Qualität des Bindungsunterschieds als abhängig von der gepaarten  $\alpha$  Kette: Die rCD1d Dimerbindung wurde bei Nutzung des CDR3 $\beta$  #2 in Paarung mit rAV14S6, unabhängig des umgelagerten *BV* Segments signifikant reduziert. In Paarung mit rAV14S2 hingegen erwies sich diese nach Austausch von CDR3 $\beta$  #1 zu CDR3 $\beta$  #2 in Kombination mit BV8S4 als unverändert, in Kombination mit BV8S2 sogar als signifikant erhöht.

### 3.3 TCR Expression in Ratten iNKT Zellen

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung der iNKT Zellpopulation des F344 Rattenstammes wurde eine hohe Frequenz an BV8S4 Expression innerhalb der Milz und Leber iNKT Zellpopulationen (30-40%) sowie eine generelle, bereits im im Thymus beobachtbare Tendenz zur Nutzung der Typ 2 *AV14* Segmente festgestellt [78]. Ebenso wurde eine hohe Frequenz von Glycin an Position 93 der AV14/AJ18 TCR  $\alpha$  Kette nach somatischer Rekombination beschrieben [78, 83]. Zur genaueren Charakterisierung der TCR  $\alpha$  und  $\beta$  Kettenexpression von Ratten iNKT Zellen wurden primäre iNKT Zellen aus Milzzellen von F344 Ratten expandiert und untersucht.

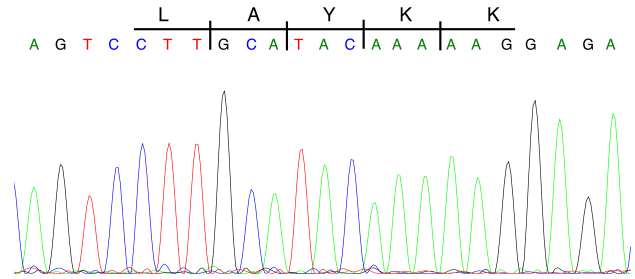
#### 3.3.1 Expansion von Ratten iNKT Zellen

Die Frequenz von iNKT Zellen in der Milz von F344 Ratten beträgt nur ca. 0,05 - 0,1% aller T Zellen [78] (vgl. Abb. 3.23A). Zur ausführlichen Charakterisierung der in dieser Population und deren Subpopulationen exprimierten TCR  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten muss deren Expansion erfolgen. Das Prinzip der *in vitro* Expansion von iNKT Zellen der F344 Ratte wurde bereits beschrieben [78]. Diese basiert auf der spezifischen Aktivierung der iNKT Zellpopulation mittels des liniendefinierenden Antigens  $\alpha$ GC. Auf dieser Grundlage beruhend wurden Milzzellen der F344 Ratte in Gegenwart des  $\alpha$ GC Derivats PBS57 kultiviert (vgl. 2.2.3.10). An Tag 7 der Kultur betrug deren Frequenz bereits ca. 5% und nach weiteren sieben Tagen in Kultur mit PBS57 konnten ca. 80% der in Kultur befindlichen Zellen als iNKT Zellen identifiziert werden. Diese wurden mittels rCD1d Dimerfärbung sortiert und weiterkultiviert, wobei ein wöchentlicher Stimulus von TCR und CD28 der kultivierten iNKT Zellen mittels rCD1d:PBS57 Dimer und anti-rCD28 mAb (JJ316) beschichteter Dynabeads erfolgte (vgl. 2.2.3.11). Die Reinheit der sortierten iNKT Zellen blieb im Verlauf der anschließenden Kultivierung konstant bei über 98%. Innerhalb der ersten 14 Tage der Kultur konnte so die Gesamtzahl der in Kultur genommenen iNKT Zellen um den Faktor 500 erhöht werden (Kultur #1: 675x, Kultur #2: 406x) (vgl. Abb. 3.23B). Während der anschließenden Kultivierung der sortierten iNKT Zellen wurde im Schnitt eine wöchentliche Verdopplung bis Verdreifachung der Gesamtzellzahl erreicht (Kultur #1: 268x innerhalb von 9 Wochen, Kultur #2: 1556x innerhalb von 9 Wochen).



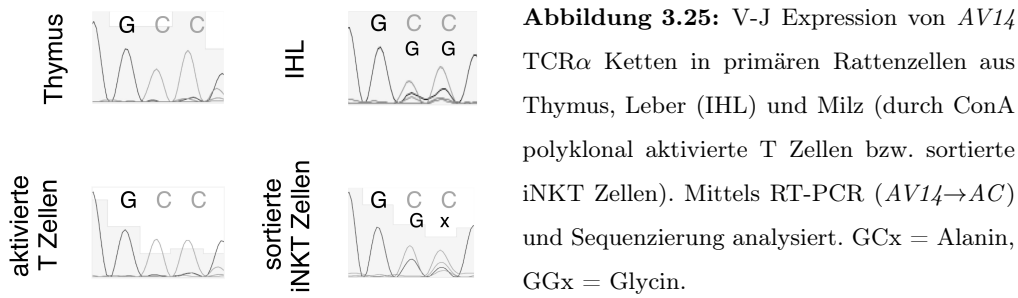
**Abbildung 3.23:** Expansion von Ratten iNKT Zellen *in vitro*. (A) Frequenz von iNKT Zellen (rCD1d:PBS57 positiv) vor (Tag 0) und während (Tag 7, 14, 63) der *in vitro* Expansion, durchflusscytometrisch anhand von Ratten CD1d Tetramerfärbung analysiert. Darstellung repräsentativ für zwei Kulturen. (B) Verlauf der relativen Zellzahl während der *in vitro* Expansion zweier Kulturen.

**Abbildung 3.24:** CDR2 $\alpha$  Sequenz sortierter expandierter iNKT Zellen (Ursprung: Milzzellen der F344 Ratte, mittels RT-PCR ( $AV14 \rightarrow AC$ ) und Sequenzierung analysiert). Sequenz repräsentativ für drei unabhängige Kulturen.

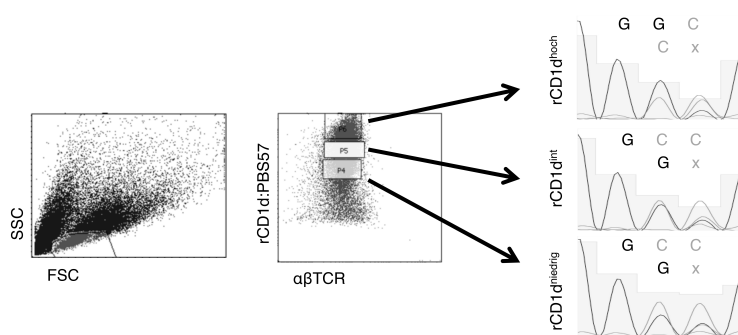


### 3.3.2 $AV14$ Expression in F344 iNKT Zellen

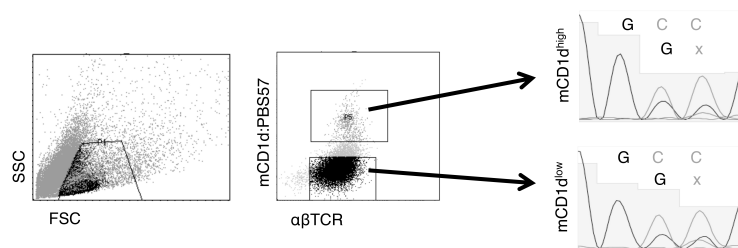
Zur Charakterisierung der in iNKT Zellen der Ratte exprimierten TCR $\alpha$  Kette wurde cDNA der gesamten expandierten iNKT Zellpopulation der F344 Milz bzw. deren Subpopulationen generiert und mittels PCR analysiert (vgl. 2.2.1.14). Die bereits beschriebene, von der iNKT TCR Umlagerung unabhängige Tendenz zur Typ 2  $AV14$  Nutzung in der F344 Ratte, konnte in Form einer reinen  $AV14S2$  Nutzung auch bei expandierten iNKT Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 3.24). Der hohe Anteil an Diversität in  $AV14/AJ18$  Umlagerungen der F344 Ratte konnte ebenfalls bestätigt werden, wobei diese Abweichungen an Position 93 zwar in Intrahepatischen Lymphocyten sowie expandierten iNKT Zellen selbst gefunden wurde, jedoch nicht in  $AV14$  Umlagerungen mit diversen  $AJ18$  Segmenten ( $AV14/AJx$ ) im Thymus oder bei polyklonal aktivierten T Zellen (vgl. Abb. 3.25). Zur Analyse des Einflusses der Diversität an Position 93 auf die Ligandenbindung der expandierten primären iNKT Zellpopulation, wurde diese durchflusscytometrisch anhand der rCD1d:PBS57 Dimerbindung in hoch- sowie intermediär- und niedrig bindende Subpopulationen sortiert und cDNA der jeweiligen Fraktionen generiert. Die Sequenzierung des  $AV14 \rightarrow AC$  PCR Produktes der jeweiligen Fraktion zeigte eine deutlich erhöhte Frequenz von Glycin (GGx) an Position 93 innerhalb der rCD1d:PBS57 hoch bindenden Ratte iNKT Zellen, während die niedrig bindenden Zellen im Vergleich die niedrigste Frequenz an Glycin aufwiesen (vgl. Abb. 3.26). Bei Untersuchung des Einflusses von Position 93 in der TCR $\alpha$  Kette von expandierten iNKT Zellen der Ratte auf die mCD1d:PBS57 Dimerbindung zeigte sich nur eine leicht erhöhte Frequenz an A93G Substitutionen innerhalb der mCD1d hoch bindenden Fraktion gegenüber der mCD1d niedrig bindenden Fraktion (vgl. Abb. 3.27). Zur Analyse der iNKT TCR $\alpha$  und  $\beta$  Kettenpaarung erfolgte die Sortierung der expandierten iNKT Zellpopulation der Ratte in BV8S4 positive und negative Subpopulationen. Die Sequenzierung des  $AV14 \rightarrow AC$  PCR Produktes der jeweiligen Population zeigte keine Unterschiede in der V-J Umlagerung der TCR $\alpha$  Kette (vgl. Abb. 3.28).



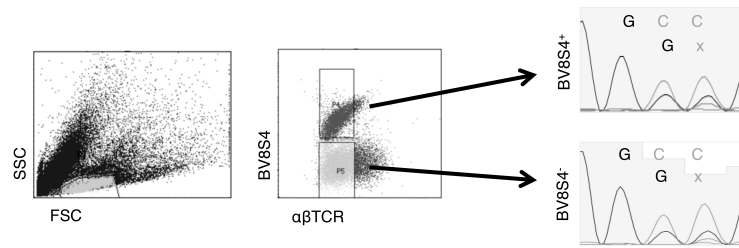
**Abbildung 3.25:** V-J Expression von AV14 TCR $\alpha$  Ketten in primären Rattenzellen aus Thymus, Leber (IHL) und Milz (durch ConA polyklonal aktivierte T Zellen bzw. sortierte iNKT Zellen). Mittels RT-PCR (AV14 $\rightarrow$ AC) und Sequenzierung analysiert. GCx = Alanin, GGx = Glycin.



**Abbildung 3.26:** Durchflusszytometrische Sortierung hoch- sowie intermediär- und niedrig rCD1d Dimer bindender iNKT Zellen und Sequenzanalyse des V-J Übergangs der TCR $\alpha$  Kette (p93 $\alpha$ ). Gezeigt sind Lebendgate und ausgewählte Fractionen der Sortierung. Sortierte Fractionen wurden mittels RT-PCR (AV14 $\rightarrow$ AC) und Sequenzierung analysiert. GCx = Alanin, GGx = Glycin. Darstellung repräsentativ für drei unabhängige Kulturen.



**Abbildung 3.27:** Durchflusszytometrische Sortierung hoch- sowie niedrig mCD1d Dimer bindender iNKT Zellen und Sequenzanalyse des V-J Übergangs der TCR $\alpha$  Kette (p93 $\alpha$ ). Gezeigt sind Lebendgate und ausgewählte Fractionen der Sortierung. Sortierte Fractionen wurden mittels RT-PCR (AV14 $\rightarrow$ AC) und Sequenzierung analysiert. GCx = Alanin, GGx = Glycin.



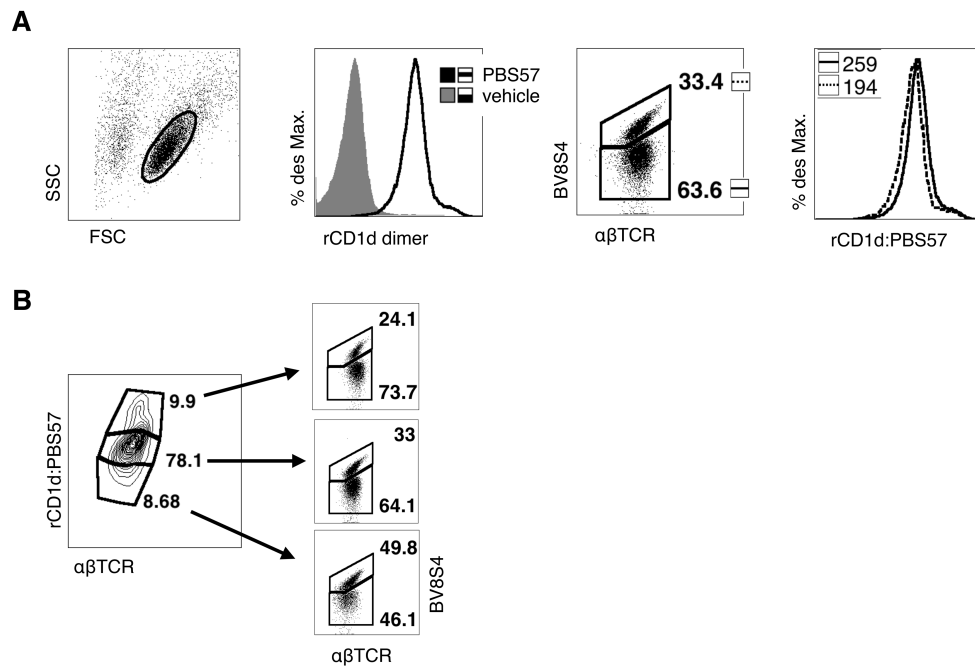
**Abbildung 3.28:** Durchflusscytometrische Sortierung BV8S4 positiver und negativer iNKT Zellen und Sequenzanalyse des V-J Übergangs der TCR $\alpha$  Kette (p93 $\alpha$ ). Gezeigt sind Lebendgate und ausgewählte Fraktionen der Sortierung. Sortierte Fraktionen wurden mittels RT-PCR ( $AV14 \rightarrow AC$ ) und Sequenzierung analysiert. GCx = Alanin, GGx = Glycin.

### 3.3.3 BV Expression in F344 iNKT Zellen

Bisher wurde einzig *BV8S4* als mit dem iNKT TCR assoziiertes *BV* Segment in der Ratte direkt beschrieben und ca. 30-40% der iNKT Zellpopulation in der F344 Ratte wurde als BV8S4 positiv charakterisiert [78]. Expandierte iNKT Zellpopulationen der F344 Ratte (vgl. 3.3.1) zeigten eine vergleichbare Frequenz an BV8S4 positiven Zellen (vgl. Abb. 3.29A und Abb. 3.30A). Durchflusscytometrische Untersuchungen der CD1d Dimerbindung dieser Populationen zeigten eine schwächere Ratten CD1d Dimerbindung BV8S4 positiver Zellen (vgl. Abb. 3.29A), während Maus CD1d Dimere unabhängig der BV8S4 Expression vergleichbar gebunden wurden (vgl. Abb. 3.30A), wobei die Frequenz an mCD1d niedrig bindenden Zellen bei BV8S4 positiven Zellen geringer war als bei BV8S4 negativen Zellen. Ebenso wurden in der Fraktion an iNKT Zellen mit der höchsten rCD1d Dimerbindung die im Vergleich niedrigste Frequenz an BV8S4 positiven Zellen gefunden und umgekehrt (vgl. Abb. 3.29B). Wurde die Frequenz an BV8S4 Expression in Abhängigkeit der Maus CD1d Dimerbindung untersucht, zeigte sich eine Umkehrung dieses Verhältnisses (vgl. Abb. 3.30B). Die Fraktionen mit hoher und intermediärer mCD1d Dimerbindung besaßen eine vergleichbare BV8S4 Expression, während eine niedrige mCD1d Dimerbindung mit einer tendenziell niedrigeren Frequenz an BV8S4 Expression korrelierte.

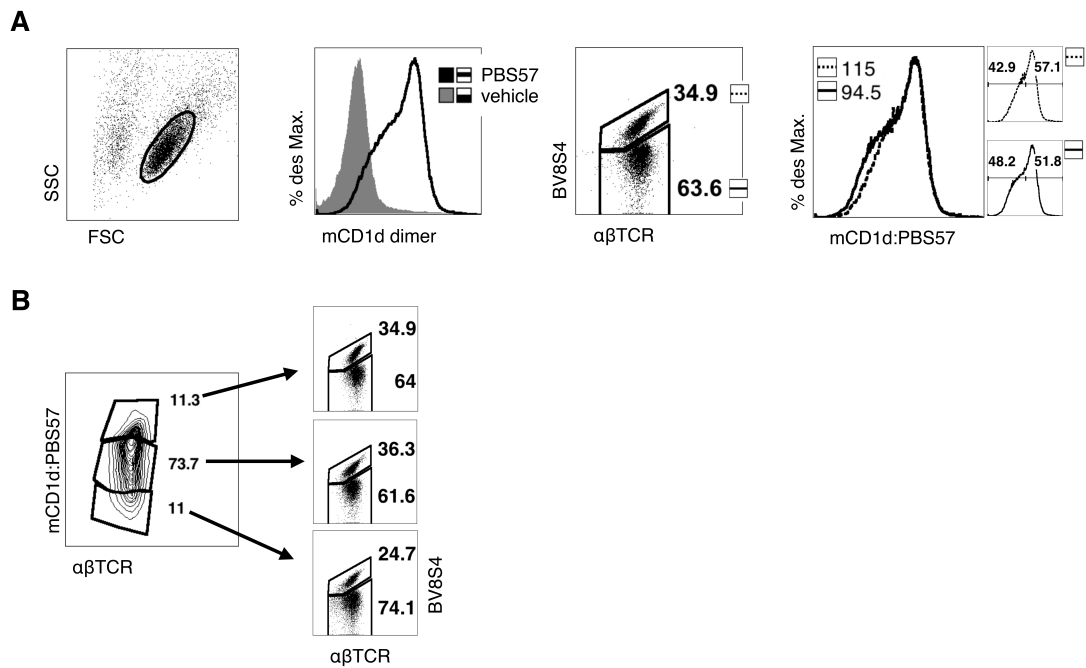
Um weitere, von primären Ratten iNKT Zellen exprimierte *BV* Segmente zu identifizieren, wurden expandierte iNKT Zellen der Ratte in BV8S4 positive und negative Subpopulationen durchflusscytometrisch sortiert und cDNA der jeweiligen Population generiert. Zur anschließenden Analyse der Expression verschiedener *BV* Segmente wurden spezifische, in den jeweilig zugehörigen Leader Segmenten lokalisierte Primer zur Leader $\rightarrow C\beta$  Amplifizierung genutzt. Die



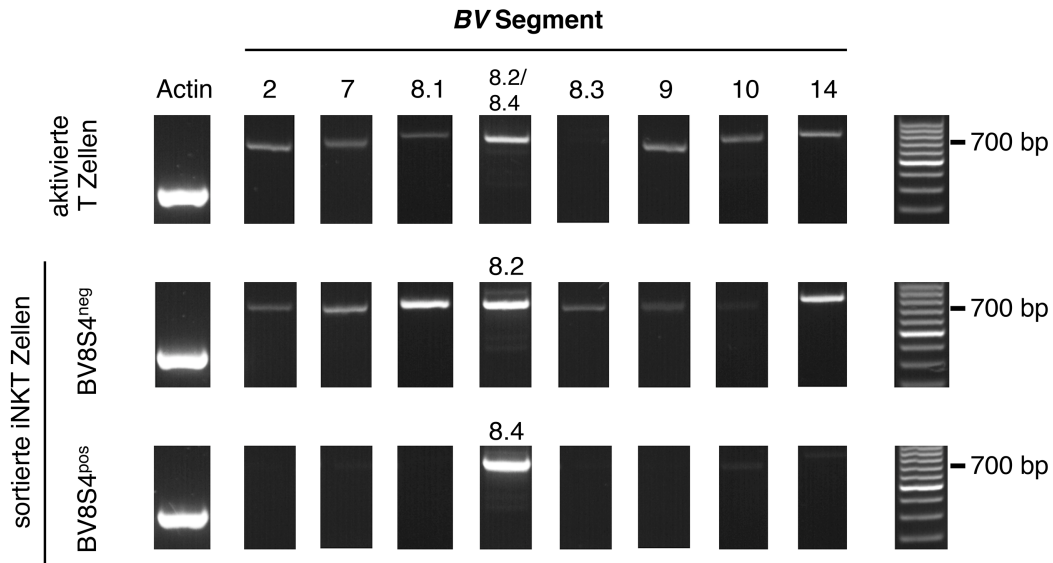


**Abbildung 3.29:** Durchflusscytometrische Untersuchung der rCD1d Dimerbindung expandierter iNKT Zellen der Ratte. Gezeigte Färbung repräsentativ für drei unabhängige Kulturen. (A) Dimerbindung der expandierten iNKT Population der Ratte und deren BV8S4 positiver und negativer Subpopulationen. Angegeben sind Populationsfrequenzen (2.v.r.) und Geometrischer Mittel der CD1d:PBS57 Färbung (1.v.r.) (B) Frequenz der BV8S4 Expression in Abhängigkeit der rCD1d Dimerbindung.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.30:** Durchflusszytometrische Untersuchung der mCD1d Dimerbindung expandierter iNKT Zellen der Ratte. Gezeigte Färbung repräsentativ für drei unabhängige Kulturen. (A) Dimerbindung der expandierten iNKT Population der Ratte und deren BV8S4 positiver und negativer Subpopulationen. Angegeben sind Populationsfrequenzen (2.v.r.) und Geometrischer Mittel der CD1d:PBS57 Färbung (1.v.r.) (B) Frequenz der BV8S4 Expression in Abhängigkeit der mCD1d Dimerbindung.



**Abbildung 3.31:** BV Expression von BV8S4 positiven und negativen iNKT Zellen der Ratte. Amplifizierte Leader→C $\beta$  PCR Produkte generiert wie in 2.2.1.15 beschrieben.

untersuchten BV Segmente sind homolog zu den im Maus iNKT TCR bereits als funktionell charakterisierten Segmenten [70]. Neben der Untersuchung der sortierten iNKT Zellpopulationen wurde zum Vergleich auch die cDNA mittels ConA polyklonal aktivierter T Zellen der F344 Milz untersucht, um Abweichungen der Expressionsfrequenz zwischen iNKT Zellpopulation und polyklonaler T Zellen darzustellen. Unter den untersuchten BV Segmenten wurde in der iNKT Zellpopulation der F344 Ratte neben dem bereits charakterisierten *BV8S4* vor allem die Expression von *BV8S2*, ebenso homolog zum *BV8S2* der Maus, sowie *BV8S1*, *BV14* und *BV7* gefunden (vgl. Abb. 3.31). Da durch die jeweiligen Primer nicht zwischen *BV8S2* und *BV8S4* unterschieden werden konnte, wurden die im Zuge dieser cDNA Analyse generierten PCR Produkte zur Bestätigung der erfolgreichen Sortierung BV8S4 positiver und negativer iNKT Zellpopulationen sequenziert. Wie erwartet, erwies sich das *BV8S2/BV8S4* PCR Produkt in der sortierten BV8S4 positiven Population als *BV8S4*, in der sortierten BV8S4 negativen Population hingegen als *BV8S2* (Daten nicht gezeigt).

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.2:** Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere der Ratte (vgl. Abb. 3.7). Maximale Bindung bei Beladung mit  $\alpha$ GC, DB01-1 und PBS44 erreicht in Gegenwart von Triton X-100, bei Beladung mit PBS57 in Gegenwart von Tyloxapol. Oben angegeben: Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils mindestens drei unabhängig durgeführten Experimenten (vgl. 3.1.2). Statistischer Vergleich der Dimerbindungen mittels ungepaartem t-Test, in Klammern: p-Wert. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

CD1d Ratte				
	$\alpha$ GC (C26:0)	DB01-1 (C24:0)	PBS44 (C24:1)	PBS57 (C24:1)
	0,4646 $\pm 0,05957$	0,2433 $\pm 0,04922$	0,2975 $\pm 0,1444$	0,6049 $\pm 0,07997$
$\alpha$ GC (C26:0)	•	** (0,0077)	ns (0,1374)	ns (0,0715)
DB01-1 (C24:0)	** (0,0077)	•	ns (0,5718)	** (0,0026)
PBS44 (C24:1)	ns (0,1374)	ns (0,5718)	•	* (0,0321)
PBS57 (C24:1)	ns (0,0715)	** (0,0026)	* (0,0321)	•

**Tabelle 3.3:** Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere der Maus (vgl. Abb. 3.7). Maximale Bindung bei Beladung von  $\alpha$ GC und PBS57 erreicht in Gegenwart von Tween20, mit DB01-1 in Gegenwart von Triton X-100, mit PBS44 in Gegenwart von Tyloxapol. Oben angegeben: Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (vgl. 3.1.2). Statistischer Vergleich der Dimerbindungen mittels ungepaartem t-Test, in Klammern: p-Wert. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

CD1d Maus				
	$\alpha$ GC (C26:0)	DB01-1 (C24:0)	PBS44 (C24:1)	PBS57 (C24:1)
	0,9823 $\pm 0,03402$	0,3482 $\pm 0,05726$	0,6630 $\pm 0,2111$	1,295 $\pm 0,2186$
$\alpha$ GC (C26:0)	•	*** ( $< 0,0001$ )	ns (0,0609)	ns (0,0706)
DB01-1 (C24:0)	*** ( $< 0,0001$ )	•	ns (0,0673)	** (0,0019)
PBS44 (C24:1)	ns (0,0609)	ns (0,0673)	•	* (0,0227)
PBS57 (C24:1)	ns (0,0706)	** (0,0019)	* (0,0227)	•

**Tabelle 3.4:** Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere des Menschen (vgl. Abb. 3.7). Alle maximalen Bindungen erreicht bei Beladung in Gegenwart von Tyloxapol. Oben angegeben: Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (vgl. 3.1.2). Statistischer Vergleich der Dimerbindungen mittels ungepaartem t-Test, in Klammern: p-Wert. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

CD1d Human				
$\alpha$ GC	DB01-1	PBS44	PBS57	
(C26:0)	(C24:0)	(C24:1)	(C24:1)	
0,9160	0,4170	0,4760	1,209	
$\pm 0,2711$	$\pm 0,07353$	$\pm 0,1076$	$\pm 0,1962$	
<b><math>\alpha</math>GC (C26:0)</b>	•	*	ns	ns
	(0,0370)	(0,0592)	(0,2044)	
<b>DB01-1 (C24:0)</b>	*	•	ns	**
	(0,0370)	(0,4767)	(0,0028)	
<b>PBS44 (C24:1)</b>	ns	ns	•	**
	(0,0592)	(0,4767)	(0,0048)	
<b>PBS57 (C24:1)</b>	ns	**	**	•
	(0,2044)	(0,0028)	(0,0048)	

**Tabelle 3.5:** Statistische Auswertung der Untersuchung von CDR2 $\alpha$  und HV4 $\alpha$  (vgl. Abb. 3.12). Oben angegeben: Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Dimerbindungswerte der entsprechenden TCR $\alpha$  Ketten, gepaart mit CDR(2+4) (BV8S4-ähnliche) TCR $\beta$  Kette wurden wie beschrieben berechnet (vgl. 3.2). Statistischer Vergleich der Dimerbindungen mittels ungepaartem t-Test, in Klammern: p-Wert. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

	rAV14S6 93A					rAV14S2 93A		
	S6	S6	S6	S6	S6	S2	S2	S2
		T1→2	T1→2++	T1→2++ A68E	A68E		T2→1	E68A
	98,89	75,50	86,80	26,13	33,80	23,61	17,83	62,93
	$\pm 12,84$	$\pm 24,67$	$\pm 29,30$	$\pm 13,64$	$\pm 7,41$	$\pm 8,60$	$\pm 3,59$	$\pm 14,85$
<b>S6</b>	•	ns	ns	***	***	***	***	*
		(0,1321)	(0,4718)	(0,0008)	(0,0006)	(<0,0001)	(0,0001)	(0,0184)
<b>S6 T1→2</b>	ns	•	ns	*	*	**	**	ns
	(0,1321)		(0,5280)	(0,0204)	(0,0323)	(0,0054)	(0,0080)	(0,4618)
<b>S6 T1→2++</b>	ns	ns	•	*	*	**	**	ns
	(0,4718)	(0,5280)		(0,0164)	(0,0244)	(0,0044)	(0,0077)	(0,2459)
<b>S6 T1→2++ A68E</b>	***	*	*	•	ns	ns	ns	*
	(0,0008)	(0,0204)	(0,0164)		(0,4405)	(0,7740)	(0,3657)	(0,0341)
<b>S6 A68E</b>	***	*	*	ns	•	ns	*	*
	(0,0006)	(0,0323)	(0,0244)	(0,4405)		(0,1622)	(0,0284)	(0,0384)
<b>S2</b>	***	**	**	ns	ns	•	ns	**
	(<0,0001)	(0,0054)	(0,0044)	(0,7740)	(0,1622)		(0,3314)	(0,0066)
<b>S2 T2→1</b>	***	**	**	ns	*	ns	•	**
	(0,0001)	(0,0080)	(0,0077)	(0,3657)	(0,0284)	(0,3314)		(0,0069)
<b>S2 E68A</b>	*	ns	ns	*	*	**	**	•
	(0,0184)	(0,4618)	(0,2459)	(0,0341)	(0,0384)	(0,0066)	(0,0069)	

**Tabelle 3.6:** Statistische Auswertung der Untersuchung von *BV* Segment und CDR3 $\beta$  (vgl. Abb. 3.22). Oben angegeben: Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Dimerbindungswerte der entsprechenden TCR $\alpha$  Ketten, gepaart mit CDR(2+4) (BV8S4-ähnliche) TCR $\beta$  Kette wurden wie beschrieben berechnet (vgl. 3.2). Statistischer Vergleich der Dimerbindungen mittels ungepaartem t-Test, in Klammern: p-Wert. ns:  $p > 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .

		rAV14S6 93A				rAV14S2 93A			
		S6 93A	S6 93A	S6 93A	S6 93A	S2 93A	S2 93A	S2 93A	S2 93A
		BV8S4	BV8S4	BV8S2	BV8S2	BV8S4	BV8S4	BV8S2	BV8S2
		CDR3 $\beta$ #1	CDR3 $\beta$ #2	CDR3 $\beta$ #1	CDR3 $\beta$ #2	CDR3 $\beta$ #1	CDR3 $\beta$ #2	CDR3 $\beta$ #1	CDR3 $\beta$ #2
		98,89	37,23	67,40	36,20	23,61	24,20	13,58	22,80
		$\pm 12,84$	$\pm 8,98$	$\pm 11,46$	$\pm 5,77$	$\pm 8,60$	$\pm 3,03$	$\pm 1,32$	$\pm 5,08$
S6 BV8S4	•	***	**	***	***	***	***	***	***
CDR3 $\beta$ #1		(0,0009)	(0,0048)	(0,0006)	(<0,0001)	(0,0002)	(<0,0001)	(0,0002)	
S6 BV8S4	***	•	*	ns	ns	ns	**	ns	
CDR3 $\beta$ #2	(0,0009)		(0,0123)	(0,08749)	(0,0971)	(0,0758)	(0,01)	(0,0726)	
S6 BV8S2	**	*	•	**	***	***	***	***	
CDR3 $\beta$ #1	(0,0048)	(0,0123)		(0,0030)	(0,0009)	(0,0002)	(<0,0001)	(0,0004)	
S6 BV8S2	***	ns	**	•	ns	*	**	*	
CDR3 $\beta$ #2	(0,0006)	(0,08749)	(0,0030)		(0,0820)	(0,0332)	(0,0024)	(0,0392)	
S2 BV8S4	***	ns	***	ns	•	ns	ns	ns	
CDR3 $\beta$ #1	(<0,0001)	(0,0971)	(0,0009)	(0,0820)		(0,9156)	(0,0978)	(0,8920)	
S2 BV8S4	***	ns	***	*	ns	•	**	ns	
CDR3 $\beta$ #2	(0,0002)	(0,758)	(0,0002)	(0,0332)	(0,9156)		(0,0032)	(0,7037)	
S2 BV8S2	***	**	***	**	ns	**	•	*	
CDR3 $\beta$ #1	(<0,0001)	(0,01)	(<0,0001)	(0,0024)	(0,0978)	(0,0032)		(0,0324)	
S2 BV8S2	***	ns	***	*	ns	ns	*	•	
CDR3 $\beta$ #2	(0,0002)	(0,0726)	(0,0004)	(0,0392)	(0,8920)	(0,7037)	(0,0324)		

## 4 Diskussion

### 4.1 Beladung von CD1d Dimeren

CD1d Oligomere haben sich als wertvolles Werkzeug zur Untersuchung von iNKT Zellen und deren TCR abhängigen Interaktionen erwiesen [50, 86, 104, 120]. Aufgrund geringer Spezieskreuzreaktivität des Ratten iNKT TCR, war die Generierung von Ratten CD1d Dimeren ein wichtiger Schritt zur direkten Identifizierung einer primärer Ratten iNKT Zellpopulation und eröffnete auch die Möglichkeit zur Analyse deren Ligandenbindungseigenschaft [78, 79]. Um diese auch auf Untersuchungen der humanen Interaktionspartner in vergleichbarer Art auszuweiten, wurden in dieser Arbeit humane CD1d Dimere zusätzlich zu denen aus Ratte und Maus in entsprechender Weise generiert und, im Vergleich mit humanen CD1d Tetrameren, anhand ihrer Bindung an humane iNKT TCR getestet (vgl. 3.1.1). Das generierte Konstrukt zeigte im Test eine deutliche Bindung an humanen iNKT TCR, vergleichbar mit der Funktionalität des humanen CD1d Tetramers, und nur geringe unspezifische Bindung in unbeladener Form.

Da iNKT Zellrezeptoren CD1d Moleküle im Komplex mit Lipidantigenen binden, müssen CD1d Dimere zuvor jedoch *in vitro* mit Lipiden beladen werden.  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ GC), ein Cerebrosid, dessen polare Kopfgruppe (Galactose)  $\alpha$  anomerisch mit der Sphingosinkette verbunden ist, stellt das meistgenutzte, da potenteste bisher bekannte Antigen der iNKT Zellen dar. Vorangegangene Versuche zeigten, dass eine effektive Beladung der generierten Ratten CD1d Dimere, erkennbar an deren Bindungsfunktionalität, nur unter Beihilfe eines Detergens möglich ist [79]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit der CD1d Beladung mit verschiedenen, auf  $\alpha$ GC basierenden, Lipidantigenen von (Art des) Detergens und Ursprung des CD1d Moleküls untersucht (vgl. 3.1.2). Die Beladung erfolgte durch Inkubation von in PBS gelösten CD1 Dimeren zusammen mit in DMSO gelösten Lipiden bei einem molaren Verhältnis von 1:40. Hierbei zeigte sich, dass die Wahl des Detergens zur Optimierung der Beladungseffektivität sowohl von der Art des CD1d Moleküls abhängt, als auch von der Struktur

des zur Beladung verwendeten Lipids.

Während der Beladung muss der hydrophobe Teil des Glycolipids in Form der beiden Lipidketten innerhalb einer wässrigen Lösung in die, zwischen den  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Helices des CD1d Moleküls verborgenen, hydrophoben Bindungstaschen A' und F' eingefügt werden. In wässriger Lösung tendieren amphiphile Moleküle zur Formierung von Micellen. Aufgrund der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit von polarer Kopfgruppe und unpolaren Lipidketten lagern sich mehrere Glycolipide zusammen. Hierbei bilden die wasserunlöslichen Lipidketten, sich parallel zueinander nach innen ausrichtend, eine eigene Phase im Inneren dieses Aggregats, die durch die verknüpften polaren Kopfgruppen von der wässrigen Umgebung abgegrenzt wird. Es ist zu erwarten, dass sich die Formierung einer derartigen Struktur negativ auf die Effektivität der Beladung auswirkt, da die solcherart zusammengelagerten Lipidketten nicht länger zugänglich sind. Zur Veränderung der spontanen Selbstassemblierung der Glycolipide kann eine Modifizierung ihrer Struktur und damit die Beeinflussung ihrer Wasserlöslichkeit ebenso wie die Zugabe von Detergenzien beitragen. Diese stellen selbst amphiphile Moleküle dar, die mit den Glycolipidaggregaten interferieren können, wobei es zu einer Verbesserung der Löslichkeit einzelner Glycolipide kommt. Dies kann die generelle Abhängigkeit der Beladungseffektivität von der Anwesenheit eines Detergens in der Lösung erklären.

Auffällig war, dass von den untersuchten  $\alpha$ GC Derivaten nur PBS57 (C24:1) ohne Zugabe von Detergenzien zur Beladung genutzt werden konnte. Ähnliche Studien der *in vitro* Beladung von CD1d aus Mensch und Maus zeigten bereits die Detergenzienabhängigkeit bei Beladung mit  $\alpha$ GC (C26:0) und DB01-1 (C24:0), die erst bei zusätzlicher Modifizierung der Alkylkette (C20:2) aufgehoben wurde [92]. Es ist daher anzunehmen, dass die hier untersuchten Veränderungen der Alkylkette in Form einer Verkürzung und der Einführung einer Doppelbindung, die Wasserlöslichkeit des Moleküls im Gesamten nicht ausreichend beeinflussen, um die Detergenzienabhängigkeit der Beladung aufzuheben. Wird jedoch zusätzlich zu den beschriebenen Modifikationen der Alkylkette die polare Kopfgruppe modifiziert, wie bei PBS57 (C24:1) in Form einer Amidgruppe am C6 Atom der Glucose, ist die Beladung nicht länger von Detergenzien abhängig. Dies weist auf eine Veränderung der Zugänglichkeit einzelner Lipidmoleküle in wässriger Lösung während des Beladungsprozesses hin. Die Veränderung der polaren Kopfgruppe führt mutmaßlich zu einer Änderung des Verhältnisses zwischen hydrophilem bzw. lipophilem Anteil des Moleküls und damit einer Veränderung seiner Eigenschaften bezüglich Löslichkeit und Aggregatbildung. Weniger wahrscheinlich erscheint hingegen eine Optimierung des Einfügens in die CD1d Bin-

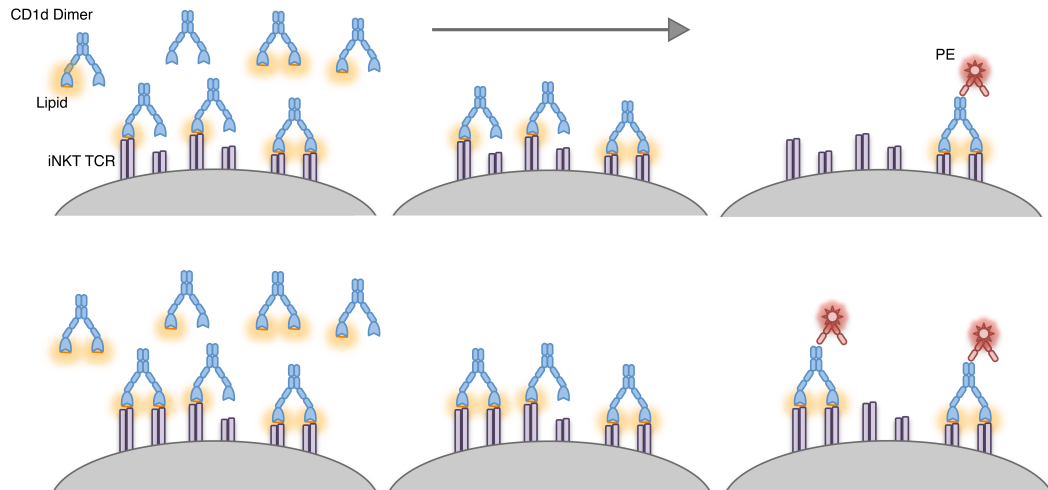


dingstaschen, wie man es bei der Modifizierung der Alkylkette erwartet, da anzunehmen ist, dass die zu jedem Zeitpunkt aus der hydrophoben Bindungstasche herausragende polare Kopfgruppe im Verlauf der Beladung eine vergleichsweise geringe Rolle spielt.

Dass die Wahl des Detergens nicht allein von der Struktur des Lipidantigens abhängt, sondern ebenso von der Beschaffenheit des CD1d Moleküls, lässt hingegen auf Unterschiede im Aufbau der Antigenbindungstaschen der CD1d Moleküle schließen. Es ist vorstellbar, dass die Interaktion eines Detergens mit der hydrophoben Bindungstasche des CD1d diese öffnet und dadurch deren Zugänglichkeit für freie Glycolipide erhöht. Da sich Maus, Mensch und Ratten CD1d auch in den Antigenbindungstaschen der jeweiligen CD1d Moleküle unterscheiden, könnte darin eine Erklärung für unterschiedliche Detergenspräferenzen während der Beladung zu finden sein. Modifikationen der Alkylkette können das Einfügen von Lipiden in die CD1d Bindungstaschen beeinflussen [92]. Die ursprünglich beobachtete Triton X-100 Abhängigkeit der Ratten CD1d Beladung mit  $\alpha$ GC (C26:0) konnte deutlich bestätigt werden, während für Maus CD1d mit Hilfe von Tween20 die höchste Wirksamkeit erzielt wurde und humanes CD1d unabhängig von der Art des eingesetzten Detergens war. Die Verkürzung der Alkylkette ( $\alpha$ GC (C26:0) zu DB01-1 (C24:0)) hatte eine Verringerung der Detergenspräferenz während der Beladung von CD1d aus Ratte und Maus zur Folge, zeigte jedoch den gegenteiligen Effekt auf die Beladung von humanem CD1d. Die Einführung eines Knickes in die Alkylkette in Form einer C-C Doppelbindung (DB01-1 (C24:0) zu PBS44 (C24:1)) verringerte die Hierarchie der Detergenspräferenz für die Beladung von CD1d aus allen untersuchten Spezies. Dies könnte auf eine vereinfachte Beladung aufgrund der verkürzten und in ihrer Konformation veränderten Alkylkette zurückzuführen sein, wodurch die optimale Öffnung der CD1d Bindungsgrube durch das Detergens einen niedrigeren Stellenwert einnimmt. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass  $\alpha$ GC (C26:0) eine diesem Knick der Alkylkette entsprechende Konformation während der Präsentation durch CD1d annimmt (Prof. Dr. Thomas Müller, persönliche Kommunikation). Dies lässt den Schluss zu, dass die Einführung der C-C Doppelbindung die Beladung von CD1d begünstigen kann.

Wie sich die Unterschiede in der Beladungseffektivität von CD1d Molekülen auf eine Dimerfärbung auswirken könnten, ist in Abbildung 4.1 dargestellt: Während der Inkubation der transduzierten Zellen mit CD1d Dimeren, befinden sich unbeladene, einfach beladene und doppelt beladene CD1d Dimere in der Lösung. Deren Verhältnis hängt von der Effektivität der vorangegangenen *in vitro* Beladung von CD1d mit dem jeweiligen Lipid ab. Im Gegensatz

## 4 Diskussion



**Abbildung 4.1:** Modell der Dimerfärbung in Abhängigkeit der Beladung. Vergleichend dargestellt: Verlauf der Dimerfärbung von iNKT TCR exprimierenden Zellen mit unterschiedlich effektiv beladenen CD1d Dimeren (oben: ineffektiv, unten: effektiv). Schritte: Inkubation/Waschen/Detektion.

zu vollständig unbeladenen CD1d Dimeren, können sowohl einfach als auch doppelt beladene CD1d Dimere an iNKT TCR binden. Geht man davon aus, dass sich die Assoziationsrate beider Arten von Dimeren nicht unterscheidet, kann man ein ihrem Verhältnis in der Lösung entsprechendes Bindungsverhältnis erwarten. Jedoch sind nur doppelt beladene Dimere in der Lage als Dimer zu fungieren und zwei iNKT TCR gleichzeitig zu binden. Dadurch wird deren Bindungsstabilität stark erhöht. Einfach beladene CD1d Dimere wären eher als Monomere zu betrachten, die durch die Beschränkung auf eine einzelne Bindung auch eine entsprechend höhere Dissoziationsrate aufweisen. Dies müsste bereits während der Inkubation dazu führen, dass vermehrt einfach beladene Dimere dissoziieren und sowohl durch einfach als auch durch doppelt beladene Dimere ersetzt werden. Hierdurch würde sich während der Inkubation, bei der sich freie Dimere im Überstand befinden, das Verhältnis zwischen einfach oder doppelt beladenen gebundenen Dimeren zugunsten der doppelt beladenen Dimere verschieben. Nach einem erfolgtem Waschschrift können dissoziierende Dimere jedoch nicht mehr in diesem Maße ersetzt werden. Geht man davon aus, dass aufgrund der hohen Dissoziation die Bindung eines Großteils der verbliebenen einfach beladenen Dimere im weiteren Verlauf der Färbung verloren geht und hauptsächlich die Bindung doppelt beladener CD1d Dimere detektiert und gemessen werden kann, so würde das anfängliche Verhältnis zwischen einfach und doppelt beladener Dimere die letztendlich gemessene maximale Bindung beschränken. Daraus würden sich, abhängig von

der Beladungseffektivität, verschiedene Sättigungen der Dimerbindung für dieselbe Interaktion ergeben, wie es sich auch im Verlauf der Beladungsuntersuchungen gezeigt hat.

Es zeigte sich jedoch nicht nur der Einfluss von Beladungsbedingungen auf die CD1d Dimerbindung, sondern auch eine signifikant niedrigere maximale Ligandenbindung bei Beladung aller CD1d Dimere mit DB01-1 (24:0) im Vergleich zu  $\alpha$ GC (C26:0). Dieser Einfluss wurde bereits für Mensch und Maus CD1d Tetramere gezeigt [92]. Die strukturellen Unterschiede beider Lipide finden sich in der modifizierten Lipidkette der  $\alpha$ GC Derivate, diese ist während der Interaktion jedoch in die hydrophoben Bindungstasche des CD1d Moleküls eingepasst und wird nicht durch den iNKT TCR gebunden. Die Konformation von CD1d wird jedoch durch dessen Beladung mit Glycolipiden verändert [121] und diese Veränderung kann, abhängig von der Länge der eingefügten Lipidketten, zu einer Veränderung der iNKT TCR Affinität führen [108]. Wahrscheinlicher scheint jedoch wiederum eine unterschiedlich effektive maximale Beladung der  $\alpha$ GC Derivate, was die maximale Dimerbindung, wie zuvor ausgeführt, beeinflussen kann und somit unabhängig von der eigentlichen iNKT TCR/CD1d:Lipid Interaktion zu deutlich veränderten Sättigungskurven führen würde. Dieser Effekt auf die Beladung wurde jedoch durch die zusätzliche Modifizierung der polaren Kopfgruppe in Form einer Addition von Acetamid am C6 Atom aufgehoben, wie bei PBS57 (C24:1) beobachtet werden konnte. Die maximale Bindung von CD1d Dimeren aller Spezies war nach Beladung mit PBS57 (C24:1) signifikant höher als nach Beladung mit PBS44 (C24:1). Die hohe Wirksamkeit von PBS57 (C24:1) als iNKT Zelligand wurde bereits beschrieben [91]. Dessen Lipidketten sind jedoch identisch mit PBS44 (C24:1). Daher muss die erhöhte Beladungseffektivität auf die Modifikation des Zuckers zurückzuführen sein, die, wie zuvor ausgeführt, dessen Löslichkeit beeinflussen kann.

Zum weiteren Vergleich der Affinitätsunterschiede unterschiedlicher  $\alpha$ GC Derivate zu CD1d Molekülen aus Mensch, Maus und Ratte, sollte deren Bindung anhand eines kompetitiven Immunassays bestimmt werden. In dieser Methode wird die Beladung von CD1d mit biotinyliertem Reporterlipid (18:1 Biotinyl Phosphoethanolamin, Bio-PE) detektiert und deren Reduktion aufgrund der Konkurrenz durch Beimischung des zu untersuchenden Lipids bestimmt. Diese Methode wurde bereits mehrfach zur vergleichenden Untersuchung der CD1d Lipidbindung eingesetzt [122–124]. Es wurden zwei verschiedene, dort beschriebene Ansätze getestet: A) Immobilisierung der CD1d Dimere auf mit anti-mIgG Antikörper beschichteten 96 well Platten, Bindung des Bio-PE an immobilisiertes CD1d, Detektion der durch die Bindung immobilisierten Bio-PE Moleküle mittels enzymgekoppeltem Streptavidin. B) Immobilisierung des Bio-PE auf

mit NeutrAvidin beschichteten 96 well Platten, Bindung der CD1d Dimere an immobilisiertes Bio-PE, Detektion der durch die Bindung immobilisierten CD1d Dimere mittels enzymgekoppeltem anti-mIgG Antikörper. Es konnte jedoch bei Ansatz A) keine (nicht biotinyliertes PE) oder eine nur teilweise (PBS57) Kompetition erreicht werden. Zusätzlich zeigte sich bei Ansatz B) eine vollständige Inhibition der CD1d/Bio-PE Interaktion unabhängig von Kompetitorlipiden auch durch alleinige Zugabe geringer Mengen von DMSO bzw. Detergens (Triton X-100). Ein Verlust der Bindung von CD1d Molekülen an eine mit biotinyliertem  $\alpha$ GC beschichtete Oberfläche durch die Zugabe von Detergens (Tween 20) oder DMSO wurde auch bei Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopieuntersuchungen beobachtet [125]. Dort wurde auch eine hohe unspezifische Bindung von CD1d Molekülen an hydrophobe Oberflächen beschrieben, die das Ergebnis von Untersuchungen dieser Art zusätzlich verfälschen kann.

### 4.2 CD1d Dimerbindungsstudien

Die *AV14* Genfamilie der Ratte unterscheidet sich hauptsächlich in der Sequenz ihrer CDR2 $\alpha$  Region, anhand derer sie gruppiert wurde [83, 84]. Durch die Nutzung von  $\alpha$ GC beladenen CD1d Dimeren [78, 79] konnte in der vorliegenden Studie deren Ligandenbindung durchflusszytometrisch untersucht werden. Hierzu wurden repräsentative Vertreter beider Typen an *rAV14* Gensegmenten mit unterschiedlichen CD1d Bindungseigenschaften mittels Mutagenese verändert und die Auswirkung auf die CD1d Dimerbindung analysiert (vgl. 3.2). Es konnte gezeigt werden, dass rCD1d: $\alpha$ GC Bindungsunterschiede, die zunächst zwischen Typ 1 und Typ 2 *AV14* enthaltenden Ratten iNKT TCR beobachtet wurden, unabhängig von den jeweiligen CDR2 $\alpha$  Sequenzen bestehen. Da der Austausch der genutzten Aminosäuresequenz zwischen Typ 1 und Typ 2 (*AV14S6* CDR2 $\alpha$  T1 $\rightarrow$ 2{++} bzw. *AV14S2* T2 $\rightarrow$ 1) keine signifikante Auswirkung auf die ursprüngliche rCD1d Bindung der entsprechenden Rezeptoren hatte, kann ein wesentlicher Einfluss dieser Region auf die Ligandenbindung ausgeschlossen werden. Die CDR2 $\alpha$  unabhängige CD1d: $\alpha$ GC Bindung von iNKT TCR Rezeptoren wurde bereits bei Mensch und Maus Rezeptoren beschrieben [67, 71, 112, 113]. Darin konnte, auch anhand von Kristallstrukturanalysen der entsprechenden Interaktion, gezeigt werden, dass kein direkter Kontakt zwischen CDR2 $\alpha$  und Ligand während der Interaktion hergestellt wird. Jedoch kann anhand einer fehlenden direkten Interaktion allein nicht ausgeschlossen werden, dass die jeweilige Region Einfluss auf die Bindung besitzt. Indirekte Effekte, wie Stabilisierung der Struktur und Konformation des

Rezeptors während der Interaktion, aber auch Erhöhung der Flexibilität, können entscheidende Bedeutung für die Ligandenbindung besitzen [75]. Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal der maßgeblicher Einfluss auf die CD1d Bindung durch die vierte Hypervariable Region der TCR $\alpha$  Kette (HV4 $\alpha$ ) von Ratte und Maus gezeigt werden. Die *rAV14* Gensegmente der Ratte weisen, unabhängig von der klassischen Einteilung anhand ihrer CDR2 $\alpha$  Sequenz, Unterschiede innerhalb ihrer HV4 $\alpha$  Regionen auf [78, 83]. Die Aminosäure an Position 68, welche sich in den untersuchten Ratten iNKT TCR *AV14* Gensegmenten unterscheidet, konnte als verantwortlich für deren Ratten CD1d Bindungsunterschiede identifiziert werden (vgl. 3.2.1). Unabhängig von der CDR2 $\alpha$  Sequenz führte der Austausch des im *rAV14S6* (Typ 1) genutzten Alanins zu Glutaminsäure (*rAV14S6* {CDR2 $\alpha$  T1 $\rightarrow$ 2++} A68E) zu einer signifikant niedrigeren rCD1d: $\alpha$ GC Dimerbindung, die sich nicht von *rAV14S2* unterscheidet. Umgekehrt führte eine E68A Substitution bei *rAV14S2* zu einer signifikanten Erhöhung der Bindung. Der resultierende Rezeptor *rAV14S2* E68A zeigte eine signifikant höhere Ligandenbindung als alle untersuchten Rezeptorvarianten, die Glutaminsäure an Position 68 trugen, unabhängig von Typ des CDR2 $\alpha$  und des restlichen Gensegments. Diese Untersuchungen zeigen deutlich die Modulierung der CD1d: $\alpha$ GC Bindung durch, in Ratten *AV14* Gensegmenten natürlich auftrende, Varianten an Position 68 innerhalb des HV4 $\alpha$ . Mit dem iNKT TCR der Maus durchgeführte Bindungsanalysen der CD1d: $\alpha$ GC Interaktion zeigten keine direkte Beteiligung von Aminosäure 68 im HV4 $\alpha$  der Maus (Lysin) [71]. Durch die in der vorliegenden Arbeit erstmalig durchgeführte Alaninsubstitution von 68K im Maus iNKT TCR konnte jedoch der signifikante Einfluss dieser Position auf die Ligandenbindung auch in der Maus nachgewiesen werden. Genauere Modellierungen, anhand der bereits publizierten Kristallstrukturen, erlaubten einen Einblick in die intramolekularen Interaktionen des HV4 $\alpha$  im Maus iNKT TCR (vgl. Abb. 3.14A). Hier zeigte sich die direkte Interaktion zwischen Position 68 (K68) und dem CDR1 $\alpha$ . Von besonderem Interesse erschien die Wasserstoffbrückenbindung der K68 Seitenkette mit Asparagin an Position 31 (N31), das wesentlich zur direkten Bindung von  $\alpha$ GC beiträgt [71]. Ein Verlust dieser Interaktion, wie bei einer K68A Substitution zu erwarten wäre, könnte zu einer Destabilisierung der Struktur, einhergehend mit dem Verlust der Bindungsaffinität, führen. Wie bereits gezeigt wurde, ist die Interaktion des semi-invarianten iNKT TCR wenig flexibel [66]. Im Zuge der Bindung werden von CD1d präsentierten Antigene weitestgehend in eine durch die Konformation des iNKT TCR definierte Stellung gezwungen. Die Anpassung erfolgt somit beim Liganden, wobei es von Vorteil erscheint, einen hohen Grad an Stabilisierung innerhalb des iNKT TCR zu erreichen.

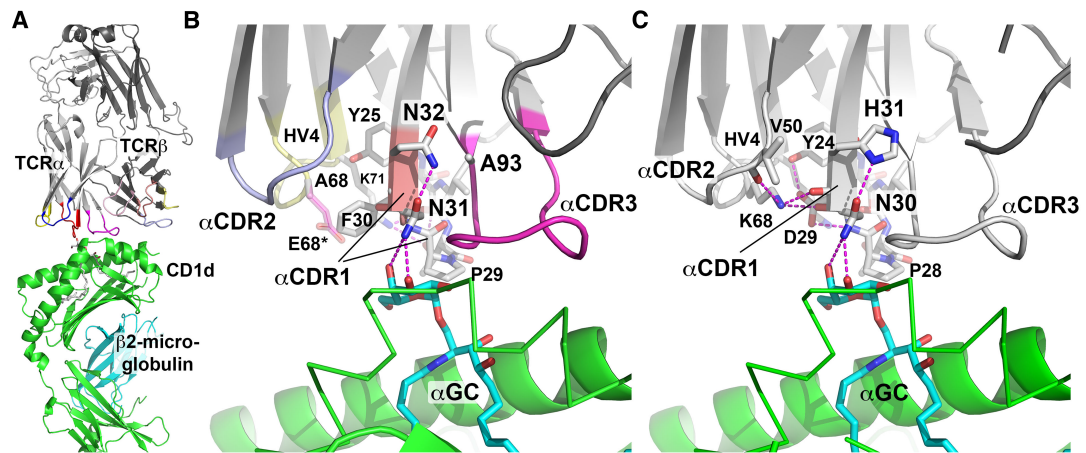
Im Gegensatz zum iNKT TCR der Maus führte die Nutzung von Alanin an Position 68 im iNKT TCR der Ratte zu keinem kompletten Verlust der CD1d: $\alpha$ GC Bindung. Um die gegensätzlichen Effekte dieser Region auf die Bindungsunterschiede des Rezeptors im Ganzen zu verstehen, müssen die Interaktionen der Aminosäurereste beider Spezies im Detail betrachtet werden. Da kein Modell der Kristallstruktur des Ratten iNKT TCR oder dessen Ligandeninteraktion existiert, wurde von Prof. Dr. Thomas Müller ein Homologiemodell der Interaktion eines Typ 1 rAV14S6 93A Ratten iNKT TCR mit rCD1d: $\alpha$ GC erstellt, welches auf der Kristallstruktur der entsprechenden Maus Interaktion basiert (PDB Code 3HE6, [71]) (vgl. Abb. 4.2). Anhand dieser Modelle war es ihm möglich, die beobachteten, unterschiedlichen Einflüsse des HV4 $\alpha$  und Effekte der Alaninsubstitution von Position 68 in beiden Spezies genauer zu erklären. Die gewonnenen Erkenntnisse bestätigten die zuvor durchgeführten Modellierungen im Detail und lieferten zusätzlich Erklärungen für den beobachteten Einfluss des HV4 $\alpha$  in der Ratte. Daher möchte ich diese im Folgenden referieren:

Die Schleifen der CDR1-3 $\alpha$  sowie der HV4 $\alpha$  Region sind durch ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Diese Vernetzung trägt zur Stabilisierung ihrer Konformation bei, welche maßgeblich für die effektive Ligandenbindung ist. CDR2 $\alpha$  und HV4 $\alpha$  bilden, wie im Modell zu erkennen, keine direkte Bindung zum Liganden aus. Jedoch entstehen Wasserstoffbrückenbindungen, die zur Positionierung der CDR3 $\alpha$  und vor allem CDR1 $\alpha$  Region beitragen. Hierbei ist speziell die Lage von Asparagin an Position 31 (Position 30 im ursprünglichen Modell) im CDR1 $\alpha$  von Interesse, da es genau über dem vom CD1d Molekül präsentierten  $\alpha$ GC positioniert wird und dieses direkt bindet (vgl. Abb. 4.2B + C). Im iNKT TCR der Maus werden die Asparaginsäure an Position 30 (D30, 29 im ursprünglichen Modell) und Asparagin an Position 31 (N31, 30 im ursprünglichen Modell) im CDR1 $\alpha$  durch Wasserstoffbrückenbindungen der Seitenkette des Lysins 68 (K68) im HV4 $\alpha$  und des Tyrosins 25 (Y25, 24 im ursprünglichen Modell) im CDR1 $\alpha$  selbst stabilisiert. Bei einer K68A Substitution, wie in dieser Arbeit durchgeführt, kommt es zu einem Verlust der Interaktion zwischen K68 und D30, sowie K68 und N31. Zusätzlich wird die negative Ladung der Seitenkette von D30 nicht länger durch die positiv geladene Seitenkette des K68 neutralisiert, was ebenso zu einer Destabilisierung des CDR1 $\alpha$  führen kann. In einigen Typ 1 iNKT TCR der Ratte, wie etwa bei rAV14S6, befindet sich an Position 68 im HV4 $\alpha$  ein Alanin. Im Gegensatz zur Maus, führt die Nutzung von 68A nicht zu einem Verlust der Ligandenbindung, während die im Typ 2 rAV14S2 Gensegment vorhandene Glutaminsäure (68E) diese signifikant reduziert. Diese Unterschiede zwischen

Maus und Ratte können durch die abweichende Sequenz des CDR1 $\alpha$  erklärt werden. Während an Position 30 im CDR1 $\alpha$  der Maus (Position 29 im ursprünglichen Modell), wie beschrieben, Asparaginsäure zu finden ist, ist diese Position in der Ratte von Phenylalanin (F30) besetzt, welches mit der hydrophoben Seitenkette von A68 wechselwirken kann. Dies trägt ähnlich zur Stabilisierung bei, wie die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen D30 und K68 im Maus iNKT TCR. Ist nun Glutaminsäure anstatt Alanin an Position 68 im HV4 $\alpha$  des Ratten iNKT TCR codiert, wird nicht nur diese hydrophobe Wechselwirkung gestört, sondern es wird auch eine ungepaarte negative Ladung in das System eingeführt und die im Vergleich längere Seitenkette des E68 ist sterisch in ungünstiger Nähe zu F30 im CDR1 $\alpha$ .

Der in den CD1d Dimerbindungsstudien dieser Arbeit erstmalig beobachtete Einfluss von Position 68 im HV4 $\alpha$  des iNKT TCR der Ratte und Maus, kann somit auf molekularer Ebene erklärt werden. Im iNKT TCR des Menschen ist ebenso Alanin an Position 68 im HV4 $\alpha$  zu finden. Der Austausch dieser Aminosäure zu einer Glutaminsäure, entsprechend den Unterschieden im Ratten iNKT TCR, führte jedoch zu keiner Veränderung der Ligandenbindung. Die Stabilisierung des CDR1 $\alpha$  scheint hier, unabhängig davon, auch bei einer K68A Substitution zu bestehen, obwohl im Menschen, wie bei der Ratte, an Position 30 im CDR1 $\alpha$  ein Phenylalanin codiert ist. Nähere Betrachtungen der Kristallstruktur der humanen iNKT TCR Interaktion mit huCD1d: $\alpha$ GC (PDB code: 2PO6 [67]) zeigten im Gegensatz zur Maus und des Homologiemodells der Ratte keine Interaktion von Position 68 im HV4 $\alpha$  des Menschen mit dem CDR1 $\alpha$  (vgl. Abb. 3.14B). Hier könnte der CDR1 $\alpha$ , der ebenso wie in der Maus entscheidend zur Lipidbindung beiträgt [67, 113], über ein differenzielles Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen unabhängig vom HV4 $\alpha$  stabilisiert werden. So bildet Serin 31 im iNKT TCR $\alpha$  des Menschen beispielsweise eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hauptkette des CDR2 $\alpha$ , die die in Maus und Ratte bestehende Interaktion mit Position 68 zu ersetzen scheint. Ebenso könnte eine abweichende Positionierung des HV4 $\alpha$  und damit der Position 68 die sterische Hinderung durch die A68E Substitution ausschließen.

Während Variabilität im HV4 $\alpha$  nur durch die Existenz verschiedener *AV14* Gensegmente möglich ist, welche keimbahncodierte Sequenzunterschiede aufweisen, können Abweichungen an Position 93 der TCR $\alpha$  Kette im Zuge der für deren Produktion nötigen somatischen Rekombination zufällig auftreten [20, 26]. Hierbei kann die keimbahncodierte Nukleotidsequenz an der Schnittstelle zwischen V und J Gensegment während der enzymabhängigen Umlagerung durch eingefügte Nukleotide verändert werden [29, 65]. Der Einfluss dieser natürlich auftretenden Di-

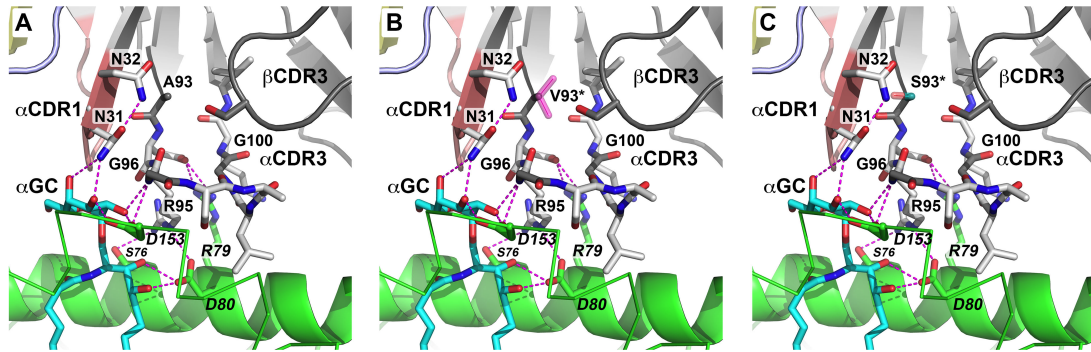


**Abbildung 4.2:** Modell der iNKT TCR Interaktion von Maus und Ratte (Homologiemodell). (A) Übersicht des Homologiemodells von Ratten CD1d (grün) in Komplex mit  $\beta_2$ -Microglobulin (cyan) und Ratten iNKT TCR (hellgrau: Typ 1 rAV14S6 93A TCR $\alpha$  Kette, dunkelgrau: CDR(2+4), BV8S4-ähnliche TCR $\alpha$  Kette). CDR $\alpha$  1-3 sowie die Hypervariable Region HV4 $\alpha$  in rot, blau, magenta sowie gelb. (B) Vergrößerte Darstellung des Kontaktes zwischen Ratten CD1d: $\alpha$ GC und Ratten iNKT TCR, mit Fokus auf Interaktion zwischen CDR1 $\alpha$  und  $\alpha$ GC (C Atome in cyan abgebildet). A68E Substitution im HV4 $\alpha$  transparent dargestellt, C Atome in magenta. (C) wie (B), jedoch für die ursprüngliche Interaktion zwischen Maus iNKT TCR und Maus CD1d: $\alpha$ GC. (A-C) Anmerkung: Zählung der Aminosäurereste 1-60 im ursprünglichen Modell der Mausinteraktion entspricht 2-61 der in dieser Arbeit genutzten Zählung, ab Position 62: identische Zählung. Position 61 ist im ursprünglichen Modell nicht vergeben. Ursprüngliches Modell der Maus iNKT TCR Interaktion: PDB Code 3HE6, [71]. Modellierung durchgeführt von Prof. Dr. Thomas Müller.



versität am Beginn des CDR3 $\alpha$  des iNKT TCR auf die Bindung diverser Lipidantigene wurde im Menschen bereits beschrieben [75]. Die gefundenen Abweichungen (Threonin, Asparagin oder Isoleucin anstatt des keimbahncodierten Serins) gingen mit einem Verlust an Avidität einher, was die Bedeutung einer kanonischen, invarianten TCR $\alpha$  Sequenz im iNKT TCR unterstreicht. In der Ratte wurden, neben dem keimbahncodierten Alanin, Glycin und Valin in umgelagerten iNKT TCR $\alpha$  Ketten an Position 93 beschrieben [69, 78, 79, 83]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung dieser natürlichen Variabilität auf die CD1d Dimerbindungseigenschaften verschiedener Ratten iNKT TCR untersucht (vgl. 3.2.2). Ebenso wie für den Menschen beschrieben [75], zeigte Position 93 der iNKT TCR $\alpha$  Kette in Maus und Ratte einen signifikanten Einfluss auf die Ligandenbindung.

Im Typ 1 *rAV14S6* Gensegment bewirkte die A93V Substitution eine Reduktion der Bindung von rCD1d: $\alpha$ GC auf ein Minimum, wie es auch die aus primären IHL klonierte iNKT TCR $\alpha$  Kette *rAV14S8 93V* zeigte, dessen Ligandenbindung nach der reversen V93A Substitution signifikant erhöht wurde. Diese Ergebnisse erklären die ursprünglich beobachteten Unterschiede in Bindung und Aktivierung zwischen diesen Vertretern der Typ 1 *rAV14* Gensegmente [69]. Im Gegensatz hierzu führte eine A93G Substitution bei *rAV14S6* zu einer signifikanten Erhöhung der rCD1d Dimerbindung. Darüber hinaus ermöglichte die Nutzung von Glycin an Position 93 die Bindung speziesfremder CD1d Dimere aus Maus und Mensch. Diese Spezieskreuzreaktivität ist auch für den Maus iNKT TCR beschrieben, in dem Glycin an Position 93 in der kanonischen iNKT TCR $\alpha$  Umlagerung präsent ist [21, 26]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die beobachtete Spezieskreuzreaktivität des Ratten iNKT TCR nach einer A93G Substitution darauf zurückzuführen ist, dass die Sequenz der TCR $\alpha$  Kette der Maus ähnlicher wurde. Jedoch führte eine entsprechende A93S Substitution, welche den Ratten iNKT TCR dem des Menschen ähnlicher gestaltet, nicht zu einer signifikant erhöhten Bindung von CD1d Dimeren aus Mensch und Maus, während die Bindung an Ratten CD1d Dimeren weitestgehend erhalten blieb. Daher ist anzunehmen, dass 93G im iNKT TCR $\alpha$  der Ratte dessen Bindungsfähigkeit generell erhöht. Darauf weisen auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der primären iNKT Zellpopulation hin (vgl. 3.3), die eine Erhöhung der CD1d Bindung durch die A93G Substitution im natürlichen System zeigten. Dieser Effekt kann darin begründet liegen, dass die CDR3 $\alpha$  Schleife nach einer A93G Substitution aufgrund der geringen Größe von Glycin eine flexiblere Struktur aufweist und somit die Bindung vereinfacht. Genauere Betrachtungen des Homologie-modells (vgl. Abb. 4.3), durchgeführt von Prof Dr. Thomas Müller, zeigten, dass Alanin die



**Abbildung 4.3:** Homologiemodell des iNKT TCR der Ratte mit Fokus auf Position 93 im CDR3 $\alpha$ . (A) Position 93 = Alanin. (B) Position 93 = Valin. (C) Position 93 = Serin. Modellierung durchgeführt von Prof. Dr. Thomas Müller.

Bildung der iNKT TCR typischen Konformation des CDR3 $\alpha$  zwar nicht sterisch behindert, jedoch dessen Positionierung über dem Liganden weniger begünstigt. Der Austausch zu Serin hingegen führt eine polare Seitengruppe in das System ein, welche mit dem oben beschriebenen Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen interferieren könnte, welche das CDR1 $\alpha$  stabilisiert, während die unpolare Seitenkette von Valin durch die erhöhte räumliche Ausdehnung sterisch ungünstig erscheint.

Natürlich auftretende Abweichungen von der kanonischen *AV14/AJ18* Umlagerung an Position 93, dem Beginn des CDR3 $\alpha$ , wurden in der Maus mehrfach beschrieben [21, 26, 69, 114–116]. Jedoch wurde bisher nur der Einfluss von Position 94 bis Position 99 des CDR3 $\alpha$  auf die CD1d Bindung des iNKT TCR der Maus untersucht [68]. Speziell an Position 94 tritt in der Maus natürliche Variabilität in ähnlicher Weise auf, wie an Position 93 [46], was mit Veränderungen der Ligandenbindung einhergeht. In der vorliegenden Arbeit konnte nun zusätzlich auch die signifikante Reduktion der CD1d Bindung durch eine natürlich auftretende Alaninsubstitution an Position 93 der Maus iNKT TCR $\alpha$  Kette gezeigt werden. Der generelle Vorteil der Nutzung eines Glycin an Position 93 im iNKT TCR $\alpha$  sollte auch für den Menschen getestet werden, für den dieses nicht zu den dort natürlich auftretenden Varianten gehört [26]. Hier zeigte sich erneut eine tendenzielle Erhöhung der Bindung von CD1d Dimere aus Ratte und Mensch, jedoch war diese nicht statistisch signifikant. Allerdings zeigte der humane iNKT TCR bereits bei Nutzung des kanonischen Serins an Position 93 $\alpha$  eine ebenso starke Ligandenbindung wie der iNKT TCR der Maus mit Glycin an Position 93 $\alpha$  und eine deutlich höhere Kreuzreaktivität mit Ratten CD1d.

Die beobachteten Bindungsunterschiede zwischen 93A und 93G im iNKT TCR $\alpha$  von Maus und Ratte spiegelten sich in vergleichbarem Muster ebenso in der Aktivierung dieser Rezeptoren wider. rAV14S6 93G iNKT TCR transduzierte Zellen zeigten bereits bei niedrigerer Dimerkonzentration, im Vergleich zu mit rAV14S6 93A iNKT TCR transduzierten Zellen eine tendenziell stärkere Stimulation durch Ratten CD1d:PBS57 Dimere. Darüber hinaus wurde eine starke Stimulation durch CD1d Dimere fremder Spezies ermöglicht. Beim Maus iNKT TCR, der ein keimbahncodiertes Glycin an Position 93 enthält, konnte im Vergleich mit einer G93A Substitution eine generell stärkere Stimulation durch CD1d Dimere aller Spezies beobachtet werden. Die S93G Substitution im humanen iNKT TCR hatte kaum Auswirkungen auf dessen Stimulation, die ähnlich der Stimulation des iNKT TCR der Maus unabhängig von der Art der CD1d Dimere war. Zusammen bestätigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der V-J Umlagerung deren hohen Einfluss auf die Ligandinteraktion. Zusätzlich konnte Position 93 als Schlüssel für die bereits beschriebene Speziespezifität des Ratten iNKT TCR identifiziert werden [69, 78, 79].

Im Vergleich zeigte sich für den iNKT TCR von Maus und Mensch eine niedrigere Bindung an Ratten CD1d als an CD1d Dimere aus Maus und Mensch, wie es schon für primäre iNKT TCR Populationen der Maus beschrieben wurde [78]. Die hohe Kreuzreaktivität zwischen Maus und Mensch bestätigte sich hingegen. Ebenso wurde eine generell schwächere Bindung von Ratten iNKT TCR an Ratten CD1d beobachtet als bei der Interaktion von Maus iNKT TCR und Maus CD1d oder humanem iNKT TCR und humanem CD1d. Dies weist auf generelle Unterschiede im Ratten CD1d oder dessen Lipidpräsentation hin, welche die Bindung des iNKT TCR benachteiligen könnte.

Alle Bindungsstudien zur Untersuchung der iNKT TCR $\alpha$  Ketten wurden mit einer konstanten  $\beta$  Kette durchgeführt, die einer BV8S4  $\beta$  Kette der F344 Ratte gleicht [69, 85, 100]. Eine V14L Substitution, der einzige Unterschied zwischen CDR(2+4) und dem BV8S4 Segment der F344 Ratte, ist ohne Einfluss auf die Ligandenbindung des iNKT TCR (Daten nicht gezeigt). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass das genutzte BV Segment, wie auch die durch die V-D-J Umlagerung definierte CDR3 $\beta$  Region, Einfluss auf die Ligandenbindung des iNKT TCR in Mensch und Maus haben [70, 113, 117, 118]. Auch für die Ratte wurde der Einfluss von CDR2 $\beta$  und HV4 $\beta$  auf Bindung und Stimulation zweier Typ 1/68A AV14 Ratten iNKT TCR gezeigt [69]. In vorliegender Arbeit wurde der Einfluss des BV Segments auf die CD1d Dimerbindung zusätzlich für einen Typ 2/68E AV14 iNKT TCR der Ratte analysiert und

auch der Einfluss des CDR3 $\beta$  in Abhängigkeit der gepaarten  $\alpha$  Kette untersucht (vgl. 3.2.3). Für alle untersuchten  $\beta$  Ketten, außer rBV8S4 CDR3 $\beta$  #2, erwies sich die rCD1d Dimerbindung in Paarung mit AV14S6 (Typ 1/68A) als signifikant besser, verglichen mit AV14S2 (Typ 2/68E). Ebenso konnte der signifikante Einfluss des *BV* Segments auf die Dimerbindung bei einer Kombination mit rAV14S6 bestätigt werden ( $BV8S4 > BV8S2$ ) und auch in Kombination mit rAV14S2 zeigte sich die gleiche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz. Zusätzlich zeigte der Austausch der CDR3 $\beta$ , dass dieser Einfluss nicht nur von der gepaarten  $\alpha$  Kette, sondern auch von der V-D-J Umlagerung abhängt und nicht für alle CDR3 $\beta$  im Allgemeinen gültig ist. Im Gegensatz hierzu erwies sich der Einfluss des CDR3 $\beta$  zwar als signifikant für beide untersuchten  $\alpha$  Ketten, jedoch in gegensätzlicher Ausprägung. rAV14S6 zeigte unabhängig von dem umgelagerten *BV* Segment mit CDR3 $\beta$ #1 eine höhere rCD1d Dimerbindung als in Kombination mit CDR3 $\beta$ #2, während das Verhältnis bei rAV14S2 für BV8S2 sogar umgekehrt wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass während der Interaktion des Ratten iNKT TCR mit Ratten CD1d: $\alpha$ GC die  $\beta$  Kette unterschiedlich positioniert wird, abhängig davon, ob die Bindung von einer Typ 1/68A oder Typ 2/68E AV14  $\alpha$  Kette dominiert wird. Betrachtet man den potentiell negativen sterischen Einfluss der Seitenkette der im rAV14S2 an Position 68 vorhandenen Glutaminsäure, ist eine Verschiebung des CDR1 $\alpha$  und damit auch des CDR3 $\alpha$  denkbar. Davon könnte auch die Positionierung der  $\beta$  Kette beeinflusst werden, dessen CDR3 $\beta$  die CD1d: $\alpha$ GC Interaktion differenziell unterstützen kann. Einen zweiten interessanten Aspekt dieser Ergebnisse stellt der Umstand dar, dass bei gleichzeitigem Austausch von *BV* Segment und CDR3 $\beta$  eine nahezu identische rCD1d Dimerbindung erreicht wird, während diese bei Austausch nur einer dieser Komponenten verringert wurde, wie für AV14S2 gezeigt. Dies zeigt, dass der Einfluss des *BV* Segments durch differenzielle CDR3 $\beta$  Umlagerung kompensiert werden kann und umgekehrt.

### 4.3 TCR Expression von Ratten iNKT Zellen

Die primäre iNKT Zellpopulation der F344 Ratte wurde bereits hinsichtlich ihrer BV8S4 Expression (30-40%) charakterisiert [78]. Ebenso zeigte sich in jener Studie die generell in der F344 Ratte vorhandene Tendenz zur dominanten Nutzung von Typ 2 *AV14* Gensegmenten bereits im Thymus und unabhängig von V-J Umlagerung. Zusätzlich wurde in dieser Studie die bereits gezeigte Funktionalität von Typ 1/68A *AV14* Gensegmenten im Ratten iNKT TCR

bestätigt [69]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass dies nicht spezifisch für Umlagerungen des iNKT TCR (*AV14/AJ18*) oder in der Selektion von iNKT Zellen begründet ist, sondern generell in Umlagerungen von Typ 1 *rAV14* Gensegmenten im Genom der F344 Ratte. Weiterhin wurde bereits eine hohe Frequenz an nicht-kanonischen *AV14/AJ18* Umlagerungen mit A93G Substitution in der Ratten beschrieben [69, 78, 79, 83]. Zur weitergehenden Untersuchung der TCR Expression von Ratten iNKT Zellen und deren Subpopulationen wurden diese aufgrund ihrer niedrigen Frequenz *in vitro* expandiert (vgl. 3.3). Die spezifische Expansion von Ratten iNKT Zellen mittels des  $\alpha$ GC Derivats PBS57 und mit rCD1d:PBS57 Dimer/JJ316 beschichteter Dynabeads erwies sich als hoch effektiv und erlaubte die langfristige Kultivierung durchflusscytometrisch isolierter iNKT Zellen aus der Rattenmilz. Aufgrund der Art der Expansion mittels Lipidantigen, ist eine Selektion während der Expansion denkbar. Jedoch zeigten die resultierenden expandierten iNKT Zellpopulationen eine vergleichbare Frequenz an *BV8S4* positiven Zellen, eine reine *rAV14S2* Nutzung und einen ähnlichen Anteil an A93G Substitution in der TCR $\alpha$  Kette, wie es auch für primäre Populationen beschrieben wurde. Diese bestehenden Charakteristika weisen darauf hin, dass primäre und expandierte iNKT Zellpopulationen der Ratte hinsichtlich ihrer TCR Expression und Diversität vergleichbar und Rückschlüsse von expandierten iNKT Zellen auf die ursprüngliche Population zulässig sind. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung von Dimerbindung und TCR Expression expandierter iNKT Zellen der F344 Ratte zeigte deutlich den Einfluss von *AV14/AJ18* Umlagerung und der  $\beta$  Kettenexpression auf die Ligandeninteraktion. Während die *BV8S4* Expression die Bindung von rCD1d Dimeren tendenziell negativ beeinflusste, zeigte sich die Bindung von mCD1d Dimeren tendenziell unabhängiger von der  $\beta$  Kette, wobei die Expression von *BV8S4* im Gegensatz zur Bindung von rCD1d zu einer leicht verbesserten mCD1d Bindung führte. Der Einfluss des *BV* Segments auf die rCD1d:PBS57 Bindung von Ratten iNKT Zellen war nicht von der V-J Umlagerung der  $\alpha$  Kette abhängig, da in *BV8S4* positiver und *BV8S4* negativer iNKT Zellpopulation bei Untersuchung der isolierten cDNA die gleiche Frequenz an A93G Substitutionen gefunden wurden. Der negative Einfluss der *BV8S4* Expression auf die rCD1d:PBS57 Dimerbindung steht auf den ersten Blick im Kontrast zu früheren Vergleichen der CD1d Bindung verschiedener *BV* Gensegmenten, die auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnten [69] (vgl. 3.2.3). Hier zeigte sich eine erhöhte Dimerbindung von *BV8S4*  $\beta$  Ketten im iNKT TCR der Ratte im Vergleich mit *BV8S2*. Jedoch trat dieser Unterschied nur in Paarung mit Typ 1/68A *rAV14* Gensegmenten und nur für eine der beiden untersuchten V-D-J Umlagerungen der  $\beta$  Kette signifikant auf. In

Paarung mit dem Typ 2/68E Gensegment *rAV14S2* konnte dieser Unterschied ebenso nur für eine der beiden CDR $\beta$  Umlagerungen tendenziell beobachtet werden. Dennoch überrascht der ins Gegenteil umgekehrte Effekt einer *BV8S4* Expression in der expandierten iNKT Zellpopulation. In dieser polyklonalen Population muss jedoch neben der *BV* Segmentexpression auch die Diversität des CDR3 $\beta$  betrachtet werden. Wie in dieser Arbeit ebenso gezeigt, kann dieses den Einfluss des *BV* Segments kompensieren. Außerdem beinhaltet die *BV8S4* negative Population der iNKT Zellen neben *BV8S2* noch weitere *BV* Segmente, deren Einfluss auf die rCD1d Bindung nicht charakterisiert ist. Die im Vergleich zu *BV8S4* höhere CD1d Dimerbindung anderer *BV* Gensegmente innerhalb dieser Population können für die niedrigere Bindung von *BV8S2* Gensegmenten kompensieren.

Unabhängig von der  $\beta$  Kette konnte jedoch auch der Einfluss von Position 93 der TCR $\alpha$  Kette auf die rCD1d Dimerbindung von Ratten iNKT Zellen gezeigt werden. cDNA sortierter iNKT Zellen mit hoher rCD1d:PBS57 Dimerbindung beinhaltete eine höhere Frequenz an A93G Substitution in der umgelagerten *AV14*  $\alpha$  Kette als cDNA von iNKT Zellen mit niedrigerer Bindungseigenschaft. Diese Tendenz konnte auch bei *in vitro* Untersuchungen transduzierter *rAV14S2* iNKT TCR beobachtet werden, jedoch erwies sich die Verbesserung der rCD1d: $\alpha$ GC Dimerbindung bei A93G Substitution als nicht signifikant. Hierbei wurde dieser Einfluss in der TCR $\alpha$  Kette jedoch nur in Paarung mit einer Art  $\beta$  Kette untersucht. Dass sich der die Bindung verstärkende Effekt in der expandierten iNKT Zellpopulation dennoch beobachten lässt, kann in der Expression diverser  $\beta$  Ketten begründet liegen. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass die Expression von Glycin an Position 93 nicht durch kanonische *AV14/AJ18* Umlagerungen zustande kommt, sondern zusätzliche Nukleotidadditionen während dieses Prozesses nötig sind. Zusätzlich konnte sie nur bei iNKT TCR Umlagerungen des *AV14* Gensegments der Ratte in hoher Frequenz beobachtet werden, tritt jedoch bei nicht-iNKT Zellen der Ratte nicht auf. Das deutet darauf hin, dass sie einen Vorteil während der positiven Selektion von iNKT Zellen im Thymus darstellt, wodurch die Frequenz dieser nicht-kanonischen Umlagerung innerhalb der Zellpopulation nach der Selektion höher ist als ihr theoretisches zufälliges Auftreten. Die in den *in vitro* Untersuchungen transduzierter Ratten iNKT TCR beobachtete Abhängigkeit der Spezieskreuzreaktivität von einer A93G Substitution an Position 93 der  $\alpha$  Kette, konnte innerhalb der expandierten iNKT Zellpopulation nur tendenziell beobachtet werden. Während die mCD1d hoch bindende Fraktion der iNKT Zellen zwar eine leicht erhöhte Frequenz an 93G aufwies, war 93A noch immer dominant vertreten. Innerhalb der polyklonalen Population vor-

handene, nicht charakterisierte *BV* Segmente und V-D-J Umlagerungen der  $\beta$  Kette könnten zusätzlich die Spezieskreuzreaktivität beeinflussen und die beobachtete Abhängigkeit von Glycin an Position 93 der  $\alpha$  Kette, mittels verstärkter Bindung des mCD1d durch die  $\beta$  Kette, aufheben.

Zur weiteren Charakterisierung der TCR Expression von Ratten iNKT Zellen wurde die cDNA der BV8S4 negativen Population expandierter Ratten iNKT Zellen untersucht und mit cDNA polyklonal expandierter T Zellen verglichen. Im Zuge dieser Untersuchung wurden gezielt umgelagerte *BV* Segmente amplifiziert, deren Homologe im iNKT TCR der Maus als funktionell beschrieben worden waren [70]. Hierbei zeigte sich eine präferenzielle Nutzung von *BV8S1*, *BV8S2* und *BV14*. Die Auswahl der in der F344 Ratte bevorzugt zur Bildung des iNKT TCR genutzten *BV* Segmente zeigte sich somit ähnlich eingeschränkt wie in der Maus, in der bevorzugt *BV8S2* und *BV7* im iNKT TCR genutzt werden. Zusammen betrachtet zeigte die iNKT Population der F344 Ratte eine sehr eingeschränkte Variabilität hinsichtlich der TCR Expression, verglichen mit dem theoretischen Potential der genomischen Vielfalt an *AV14* Gensegmenten. Zusätzlich erwies sich die *BV* Diversität als ähnlich niedrig wie in Maus iNKT Zellen. Die vorhandenen Sequenzunterschiede der gefundenen *BV* Segmente, die hohe Frequenz nicht kanonischer V-J Umlagerungen der TCR $\alpha$  Kette und die CDR3 $\beta$  Region verbleiben somit als Quellen der Variabilität des iNKT TCR der F344 Ratte. All den genannten Bereichen konnte in dieser Arbeit Einfluss auf die Bindung von Ratten CD1d nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich die iNKT Zellpopulation im ganzen als relativ homogen in ihrer rCD1d:PBS57 Dimerbindung. Es kann daher spekuliert werden, dass entsprechende Unterschiede dieser auf die Bindung einwirkenden Faktoren selektionsbedingt größtenteils zur gegenseitigen Kompensation genutzt werden, wenn davon ausgegangen wird, dass ein begrenzter Rahmen an Affinität des iNKT TCR, innerhalb dessen eine positive Selektion im Thymus erfolgen kann, existiert. Ähnliches wurde bereits für die Selektion der iNKT Zellpopulation in der Maus vorgeschlagen [46, 73]. Jedoch kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass bei Präsentation anderer Lipidantigene Unterschiede in der Aktivierung innerhalb der iNKT Zellpopulation auftreten, die bei hochpotenten Liganden wie  $\alpha$ GC und PBS57 nicht sichtbar werden.

Die generell beobachtete fehlende Vielfalt an exprimierten *AV14* Gensegmenten in der F344 Ratte und damit auch innerhalb der iNKT Zellpopulation beschränkt die Möglichkeiten einer Diversifizierung dieser uniformen Zellpopulation zusätzlich. Zur Untersuchung dieser Auswir-

kungen müssten andere Rattenstämme herangezogen werden. LEW Ratten, deren generelle *AV14* Expression von Typ 1 Gensegmenten dominiert wird, zeigten jedoch keine detektierbare iNKT Zellpopulation [78]. Andere vielversprechende Stämme, in denen iNKT Zellen gefunden wurden, sind DA und BN [79]. Während in DA eine ähnliche Dominanz an *AV14S2* Expression gefunden wurde, zeigte BN größtenteils Expression von Typ 1 *AV14* Segmenten mit gemischter HV4 $\alpha$  Region (A. Fichtner, D. Paletta, E. Monzon-Casanova, T. Herrmann, unveröffentlichte Daten). Auffallend ist hierbei, dass F344 und DA einerseits bzw. BN und LEW andererseits, sich in ihren *Tcra* und *Tcrb* Haplotypen unterschieden. Daher besteht die Möglichkeit, dass die in F344 und DA gefundene Dominanz an Typ 2 *AV14* Gensegmenten in direktem Zusammenhang mit ihrem Haplotyp steht. Die in LEW und BN gefundene Dominanz an Typ 1 *AV14* Gensegmenten ist aufgrund des Verhältnisses der jeweiligen Anzahl im Genom hingegen eher zu erwarten. Andererseits könnte auch die *BV* Expression eine Rolle spielen. F344 und DA (*Tcrb*<sup>a</sup>) unterschieden sich von BN und LEW (*Tcrb*<sup>a</sup>) hinsichtlich ihrer *BV* Allele, so findet sich in ersteren ein funktionelles *BV8S2* Gensegment, nicht jedoch in BN und LEW [85, 126–128].

### 4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal der modulatorische Einfluss der HV4 $\alpha$  auf die iNKT TCR Bindung von Ratte und Maus gezeigt werden. Im Maus iNKT TCR führte der Verlust der Seitenketteninteraktionen von Position 68 der TCR $\alpha$  Kette auch zu einem Verlust der CD1d: $\alpha$ GC Bindung. Es gibt jedoch keine der im iNKT TCR der Maus durchgeführten K68A Substitution entsprechende *in vivo* Situation. Im Gegensatz hierzu scheint sich im iNKT TCR der Ratte ein System entwickelt zu haben, in dem sowohl Alanin als auch Glutaminsäure präsent sein können ohne die Bindungsfähigkeit komplett einzubüßen. Beide Aminosäuren sind funktionell und ihr unterschiedlicher intramolekularer Einfluss führt zu unterschiedlich starken CD1d: $\alpha$ GC Bindungen. Dies gilt jedoch nicht uneingeschränkt für alle im TCR von Ratten iNKT Zellen genutzten  $\beta$  Ketten und CDR3 $\beta$  Umlagerungen. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass einzelne Einflüsse von Regionen der  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten nicht isoliert voneinander zu betrachten sind, sondern sich gegenseitig beeinflussen. Unterschiede zwischen verschiedenen *BV* Segmenten oder CDR3 $\beta$  Regionen konnten in unterschiedlicher  $\alpha$  Kettenpaarung verschieden stark auftreten, nicht länger vorhanden sein oder sich sogar ins Gegenteil umkehren. Ähnliches konnte für das Zusammenspiel von *BV* Region und CDR3 $\beta$  innerhalb der  $\beta$  Kette selbst be-



obachtet werden. Die Bindung scheint im Allgemeinen für beide Arten der intramolekularen Stabilisierung, durch Alanin auf der einen und Glutaminsäure auf der anderen Seite, unterschiedlich von der gepaarten  $\beta$  Kette abhängig zu sein.

Die durchgeführten Untersuchungen können jedoch nur die Auswirkungen auf die Bindung von CD1d: $\alpha$ GC Komplexen wiedergeben. Werden durch die differenzielle Einflüsse von 68A bzw. 68E tatsächlich unterschiedliche Bindungsmodi eingenommen, könnten sich diese Unterschiede, je nach Art des Liganden, auch verschieden auswirken. Dies kann für starke Liganden, wie etwa  $\alpha$ GC Derivate, in ähnlicher Weise durchflusszytometrisch getestet werden. Die Bindung von mit schwächeren Liganden, wie  $\beta$ -anomerisch verknüpften Glycolipiden, beladenen rCD1d Dimeren erwies sich in ersten Experimenten jedoch als durchflusszytometrisch nicht ausreichend detektierbar. Erste Versuche zeigten jedoch, dass es durch zusätzlichem Einsatz von anti-Phycoerythrin (PE) Antikörpern möglich ist, dieses Signal zu verstärken, wie es auch für andere Oligomere beschrieben wurde [129]. Ebenso zeigte der Einsatz von rCD1d Tetrameren nach Beladung mit  $\beta$ -Glucosylceramid eine niedrige, aber detektierbare Färbung (Daten nicht gezeigt). Dennoch könnten hier sensitivere Methoden, wie die Detektion von gebundenem CD1d mittels ELISA angewendet werden, wodurch auch die Bindung von CD1d Monomeren gemessen werden könnte. Ebenso wäre die Messung von CD1d abhängiger Luciferaseaktivität eine Möglichkeit der sensitiven Detektion schwacher Bindungen. Erste Versuche der Generierung von Luciferase gekoppelten Ratten CD1d Monomeren führten aufgrund der zu geringen Produktionseffizienz jedoch zu keinem Ergebnis.

Zusätzlich stellt sich die Frage nach der physiologischen Auswirkung der Bindungsunterschiede auf die Immunantwort von Ratten iNKT Zellen. Die in dieser Arbeit verbesserte Technik der Langzeitkultivierung und Expansion von Ratten iNKT Zellen ermöglicht es, diesen Aspekt näher zu untersuchen. Erste Versuche der Stimulation einer expandierten, reinen iNKT Zellpopulation mittels rCD1d:PBS57 Dimer- und anti-rCD28 beschichteter Beads als künstliche APC, führten zu einer starken Cytokinproduktion. Dies ermöglicht den Vergleich von unterschiedlichen und mit verschiedenen Lipiden beladenen CD1d Dimeren hinsichtlich der Stimulation von Ratten iNKT Zellen oder sortierten Subpopulationen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) könnten so nicht nur Stärke der Immunantwort, sondern auch unterschiedliche Cytokinproduktion der durch den jeweiligen Stimulus aktivierten Populationen bestimmt werden. Allerdings erscheint die F344 Ratte aufgrund ihrer mangelnden Vielfalt an exprimierten *AV14* Gensegmente nicht geeignet, um die Frage nach physiologischen Konsequenzen abweichender

Bindungsmodi auf die Ratten iNKT Zellpopulation zu beantworten. Erste Versuche zeigten, dass sich hierfür der BN Stamm besser eignen könnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der iNKT TCR Interaktion der Ratte im Vergleich mit Maus und Mensch deuten auch auf Unterschiede seitens der Lipidpräsentation durch das jeweilige CD1d hin. Zum einen zeigten sich in der *in vitro* Beladung der verschiedenen Dimere deutlich abweichende Präferenzen des zur effektiven Beladung nötigen Detergens, zum anderen erwies sich CD1d: $\alpha$ GC aus der Ratte im Vergleich als weitaus schwächer in der Bindung von nicht Ratten iNKT TCR als CD1d aus Mensch oder Maus, welche untereinander eine hohe Spezieskreuzreaktivität aufweisen. Am deutlichsten zu erkennen war dieser Effekt bei der Bindung des Maus iNKT TCR. Der Grund hierfür muss in Abweichungen seitens des Ratten CD1d innerhalb der Kontaktfläche der CD1d-iNKT TCR Interaktion gesucht werden, die zu einer verringerten Bindungsfähigkeit des Maus iNKT TCR führen können. Dies betrifft die  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  Helices des CD1d selbst, aber auch Veränderungen, die eine abweichende Positionierung des Lipids zur Folge haben können. Da die charakterisierten direkten Interaktionspartner [71] seitens des CD1d zwischen Maus und Ratte bis auf eine V149M Substitution (149V kontaktiert 99L im iNKT TCR der Maus) weitestgehend konserviert sind, erscheint eine allgemeine Änderung der Konformation des CD1d oder eine unterschiedliche Positionierung der kontaktierten Atome im Zucker bzw. der Sphingosinkette des Liganden wahrscheinlich. Auf Abweichungen im Aufbau der Antigenbindungsgrube weisen auch die unterschiedlichen optimalen Beladungsbedingungen hin, die zwischen den Spezies gefunden wurden. Eine gezielte Mutagenesestudie könnte, im Falle einzelner für die verringerte Ligandenbindung verantwortlicher Aminosäuren, zur Klärung dieser Frage beitragen. Unterscheidet sich die Art der Antigenpräsentation des Ratten CD1d und die Interaktion der Ratten iNKT TCR jedoch in größerem Ausmaß von der Situation in Maus und Mensch, könnte dies nur durch eine Analyse der Kristallstruktur und deren Modellierung geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Typ 1 NKT Zellen oder iNKT Zellen (invariante Natürliche Killer T Zellen) stellen eine Subpopulation der  $\alpha\beta$  T Zellen dar, die sich durch mehrere charakteristische Eigenschaften auszeichnet. Ihr Hauptmerkmal ist die Expression eines semi-invarianten T Zellrezeptors (TCR), der die Bindung von CD1d:Glycolipid Komplexen ermöglicht, wohingegen ‚klassische‘ T Zellen an Komplexe aus MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) Molekülen und Peptiden binden. Die während der Reifung im Thymus durch Transkriptionsfaktoren festgelegte Voraktivierung der iNKT Zellen ermöglicht das unmittelbare Freisetzen von Cytokinen bei Antigenkontakt, wodurch iNKT Zellen die adaptive Immunantwort stark beeinflussen können: Sie tragen sowohl zur Regulation von Autoimmunerkrankungen als auch der Bekämpfung von Krebs und Infektionen bei.

Der iNKT TCR setzt sich aus einer invarianten  $\alpha$  Kette (*AV14/AJ18* in der Maus bzw. *AV24/AJ18* im Menschen) und einer charakteristischen Auswahl an  $\beta$  Ketten (vorwiegend *BV8S2*, *BV7* und *BV2* in der Maus und *BV11* im Menschen) zusammen. Das Cerebrosid  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ GC, KRN7000) stellt eines der potentesten Antigene für iNKT Zellen dar. Die Präsentation dieser Antigenklasse erfolgt durch CD1d Moleküle, die, abgesehen von tiefen hydrophoben Bindungstaschen, strukturell MHC I Molekülen ähneln, jedoch nicht polymorph sind und außerhalb des MHC Locus codiert sind. Die, zwischen Maus und Mensch hochkonservierte, Interaktion von iNKT TCR und CD1d: $\alpha$ GC Komplex zeichnet sich bei potenten Antigenen durch die eingeschränkte Nutzung der Antigenspezifität bestimmenden Regionen aus: CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$  und CDR2 $\beta$ . Die den CDR3 $\beta$  definierende V-D-J Umlagerung der  $\beta$  Kette stellt im iNKT TCR den Bereich der höchsten Variabilität dar, beeinflusst jedoch nur die Bindung schwächerer Antigene. Natürlich auftretende Variabilität innerhalb der  $\alpha$  Kette kann durch Abweichungen von der kanonischen V-J Umlagerung am Beginn des CDR3 $\alpha$  entstehen und beeinflusst ebenfalls die Bindung des iNKT TCR.

Die iNKT Zellpopulation in F344 Ratten ähnelt in Frequenz und Korezeptorexpression

derjenigen des Menschen. Ratten besitzen ein *CD1D* Gen, welches hoch homolog zu denen der Maus ist und zwei dem *BV8S2* Gensegment der Maus homologe *BV* Segmente (*BV8S2* und *BV8S4*), die in F344 Ratten beide funktionell sind. Eine Besonderheit der Ratte ist jedoch das Auftreten einer *AV14* Multigenfamilie von bis zu zehn Gensegmenten. Diese unterscheiden sich neben dem HV4 vor allem in ihren CDR2 Sequenzen und werden anhand dieser Unterschiede in zwei Gruppen (Typ 1 und 2) eingeteilt. Zusätzlich wurde in der iNKT Zellpopulation eine hohe Frequenz an natürlich auftretenden A93G Substitutionen in der TCR $\alpha$  Kette beschrieben und es wurde gezeigt, dass, im Gegensatz zur Kreuzreaktivität zwischen iNKT TCR und CD1d von Maus und Mensch, iNKT Zellen der Ratte nicht an Maus CD1d binden. Die Besonderheiten des Ratten iNKT TCR und deren Auswirkungen auf die TCR Expression und Ligandenbindung der Ratten iNKT Zellpopulation wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Analyse der Ratten iNKT TCR Bindung wurde erst vor kurzem durch die Generierung von Ratten CD1d Dimeren ermöglicht. Zur Optimierung der, für die Untersuchungen entscheidenden, *in vitro* Beladung von CD1d verschiedener Spezies mit Lipidantigenen, wurden Beladungsstudien mit verschiedenen  $\alpha$ GC Derivaten durchgeführt. Hierbei zeigten sich die lipidabhängige Detergensabhängigkeit der Beladung und die speziesabhängige Detergenspräferenz.

Bereits vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass sich verschiedene Vertreter der *AV14* Genfamilie der Ratte, sowie die *BV8S4* und *BV8S2* Gensegmente der  $\beta$  Kette, unterschiedliche Ligandenbindung aufweisen. Durch in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* Mutagenesestudien konnten Position 68 in der vierten Hypervariablen Schleife (HV4 $\alpha$ ) und Position 93 zu Beginn des CDR3 $\alpha$  als entscheidende Modulatoren der CD1d Bindung im iNKT TCR von Ratte und Maus identifiziert werden, wobei auch speziespezifische Unterschiede aufgedeckt werden konnten. Die Spezieskreuzreaktivität des Ratten iNKT TCR selbst hing stark von einer A93G Substitution im TCR $\alpha$  ab. Bei Untersuchungen der  $\beta$  Kette zeigte sich, dass sowohl *BV* Segmente als auch CDR3 $\beta$  Region die Ligandenbindung in differenziellem Zusammenspiel beeinflussen, was bei Paarung mit unterschiedlichen *AV14* Segmenten verschieden ausgeprägt sein konnte. Weiterhin wurden humane CD1d Dimere generiert und zum ersten Mal die Bindung von Ratten CD1d an humane iNKT TCR gezeigt.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit das TCR Repertoire von iNKT Zellen der F344 Ratte und deren CD1d Bindungseigenschaften charakterisiert. Hierzu wurde die bereits etablierte Methode der *in vitro* Expansion von iNKT Zellen aus der Rattenmilz weiterentwickelt, was die Langzeitkultur und -expansion der sortierten iNKT Zellpopulation ermöglichte. Bei Untersuchung der

TCR Expression konnte gezeigt werden, dass die Auswahl der im Ratten iNKT TCR genutzten *BV* Gensegmente ähnlich limitiert ist wie in der Maus. Neben der dominanten Nutzung der *BV8S4* und *BV8S2* Gensegmente wurden hauptsächlich *BV8S1*, *BV14* und *BV7* gefunden. Bei Untersuchungen der CD1d Dimerbindung der iNKT Zellpopulation konnte der Einfluss der natürlich auftretenden A93G Substitution in der iNKT TCR $\alpha$  Kette bestätigt werden. Außerdem zeigte sich hier ebenfalls der Einfluss des *BV* Gensegments auf die Ligandenbindung, wobei *BV8S4* negative Zellen im Vergleich zu *BV8S4* positiven Zellen eine stärkere Ratten CD1d Dimerbindung zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Studie die iNKT TCR Expression in der F344 Ratte und die Ratten iNKT TCR Interaktion durch neu generierte Reagenzien und durch die Optimierung und Weiterentwicklung etablierter Methoden zum ersten Mal ausführlich charakterisiert werden konnte. Zusätzlich vertieft wurde diese Erkenntnisse durch die Ausweitung der Untersuchungen auf die besser charakterisierten Interaktionspartner aus Maus und Mensch. Hierdurch konnten Parallelen sowie speziesspezifische Eigenheiten verdeutlicht und auch für Maus und Mensch neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Charakterisierung der Ratten iNKT TCR Interaktion ist vor allem auch durch das bessere Verständnis der iNKT Zellpopulation der Ratte von Interesse, da diese als Modellorganismus für die Untersuchung von Autoimmunkrankheiten und anderen pathologischen Zuständen genutzt wird, in denen iNKT Zellen eine wichtige Rolle spielen können.

## 6 Summary

Type 1 NKT cells, also called iNKT cells (invariant Natural Killer T cells), are a subpopulation of  $\alpha\beta$  T cells with characteristic features. Their hallmark is the expression of a semi-invariant T cell receptor (TCR) which binds CD1d:glycolipid complexes. This is in contrast to ‘conventional’ T cells which bind complexes of MHC (major histocompatibility complex) molecules and peptides. iNKT cells show a transcription factor dependent, preactivated phenotype which is obtained during their development in the thymus. This allows for immediate cytokine release after antigen encounter and enables iNKT cells to strongly influence the adaptive immune response: They are not only able to help regulating autoimmune diseases, but also contribute to the clearance of cancer and infections.

The iNKT TCR is composed of an invariant  $\alpha$  chain (*AV14/AJ18* in mice, *AV24/AJ18* in humans) and a limited number of  $\beta$  chains (mostly *BV8S2*, *BV7* and *BV2* in mice and *BV11* in humans).  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ GC, KRN7000), a cerebroside, is one of the most potent iNKT cell antigens known so far. iNKT cell antigens are presented by CD1d, a non polymorphic molecule which is encoded outside the MHC locus. CD1d molecules resemble MHC I structurally but possess deep hydrophobic pockets as antigen binding grooves. The iNKT TCR interaction with CD1d: $\alpha$ GC complexes is highly conserved between mice and humans. Its binding mode is characteristic for the restricted CDR (complementarity determining region) usage and relies mostly on CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$  and CDR2 $\beta$ . The only highly variable region within the iNKT TCR, the CDR3 $\beta$  defining diverse V-D-J rearrangement of the TCR $\beta$  chain, has been shown to only influence binding to less potent antigens. Natural variability within the TCR $\alpha$  chain is usually only possible due to non canonical *AV14/AJ18* rearrangements at the beginning of CDR3 $\alpha$  and has been shown to indirectly influence ligand binding.

The iNKT cells in F344 rats resemble human iNKT cells in terms of frequency and coreceptor expression profile. Rats have one *CD1D* gene, highly homologous to those found in mice, and two *BV8S2* homologs (*BV8S2* and *BV8S4*), which are both functional in F344 rats. Peculiar for the

rat is the presence of an *AV14* gene family with up to ten members, which have been grouped by their CDR2 $\alpha$  sequences into Type 1 and 2, and a high frequency of A93G substitutions within the iNKT TCR $\alpha$  chains. Additionally, in contrast to the species cross-reactive interaction of iNKT TCR and CD1d from mice and humans, a lack of mouse CD1d binding by the rat iNKT TCR has been demonstrated. Those characteristic features of the rat iNKT TCR and its influence on TCR expression and ligand binding of rat iNKT cells were investigated in this study.

The analysis of rat iNKT TCR binding was made possible only recently due to the generation of rat CD1d dimers. To optimize *in vitro* loading of CD1d with various  $\alpha$ GC derivatives, which is crucial for binding analysis, loading studies with CD1d dimers from different species were conducted. Thereby, it could be shown that the need for detergents during the loading process depends on the structure of the lipid, while the origin of the CD1d molecule did influence the relative efficiency of different detergents.

It was already known that differences between the *AV14* gene segments as well as differences between the *BV8S2* and *BV8S4* segments influence ligand binding of the rat iNKT TCR. Due to *in vitro* mutagenesis studies conducted in this thesis, position 68 within the fourth hypervariable loop of the TCR $\alpha$  chain (HV4 $\alpha$ ) as well as position 93 at the start of CDR3 $\alpha$  could be identified as strong modulators of CD1d binding within the iNKT TCR of rat and mouse with specific features for both species. Furthermore, species cross-reactivity of rat iNKT TCR was found to be strongly enhanced due to the naturally occurring A93G substitution within the rat TCR $\alpha$  chain. The analysis of the rat iNKT TCR $\beta$  chain showed that BV segments as well as the highly diverse CDR3 $\beta$  region influence CD1d binding in a complex interplay, which also differs depending on the paired  $\alpha$  chain. Furthermore, human CD1d dimers were generated and for the first time binding of rat CD1d to human iNKT TCRs could be shown.

Additionally, the TCR repertoire of F344 rat iNKT cells and its ligand binding has been characterized in this study. For this purpose, the already established *in vitro* expansion of rat iNKT cell from splenocytes was further developed, allowing long term culture and expansion of purified iNKT cell populations. Analysis of the TCR expression did reveal a restricted BV segment usage, similar to mouse iNKT cells. Besides the predominant usage of *BV8S2* and *BV8S4* gene segments, mainly *BV8S1* *BV14* and *BV7* were found. CD1d dimer binding studies confirmed the influence of the A93G substitution on ligand binding properties of the rat iNKT cell population and the influence of different BV segments on CD1d binding could also be seen

## 6 Summary

by comparison of BV8S4 positive and negative iNKT cell subpopulations, where BV8S4 usage led to a lower rat CD1d binding profile.

In conclusion, this study provides the first detailed characterization of iNKT TCR expression in F344 rats and the rat iNKT TCR interaction by using newly generated reagents and due to the refinement and optimization of established methods. Furthermore, new insight could be gained by also including the better characterized mouse and human interaction partners, by which similarities as well as species specific properties could be revealed. The characterization of the rat iNKT TCR interaction leads to a better understanding of the rat iNKT cell population, which can prove itself valuable, since rats are used as model organism for the investigation of several autoimmune diseases and other pathologic conditions where iNKT cells can play a major role.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur der CD1d Antigenbindungsfurche mit $\alpha$ -Galactosylceramid als Ligand	4
1.2	Struktur von $\alpha$ -Galactosylceramid	6
1.3	Struktur der Interaktion von NKT TCR und CD1d	8
1.4	Struktur der Kontaktfläche zwischen iNKT TCR und CD1d	9
3.1	Aminosäuresequenzen von CD1d in Mensch, Maus und Ratte	46
3.2	Bindungseigenschaften der generierten huCD1d Dimere	46
3.3	Struktur von $\alpha$ -Galactosylceramid im Vergleich mit dessen Derivaten DB01-1, PBS44 und PBS57	48
3.4	Analyse der Beladungseffektivität von rCD1d Dimeren	49
3.5	Analyse der Beladungseffektivität von mCD1d Dimeren	50
3.6	Analyse der Beladungseffektivität von huCD1d Dimeren	51
3.7	Maximale Bindung von unterschiedlich beladenen CD1d Dimeren	51
3.8	Aminosäuresequenzen der zugrundeliegenden iNKT TCR Ketten der Ratte	54
3.9	Bindungseigenschaften der zugrundeliegenden Ratten iNKT TCR Ketten	54
3.10	Aminosäuresequenzen der mutierten Ratten iNKT TCR $\alpha$ Ketten	55
3.11	Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d: $\alpha$ GC in Maus und Mensch als Übersicht der TCR $\alpha$ Positionierung	55
3.12	Einfluss des HV4 $\alpha$ im iNKT TCR der Ratte	56
3.13	Aminosäuresequenzen der zugrundeliegenden Maus und Mensch iNKT TCR Ketten	57
3.14	Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d: $\alpha$ GC in Maus und Mensch mit Fokus auf Aminosäure Position 68	57
3.15	Einfluss des HV4 $\alpha$ im iNKT TCR der Maus	58
3.16	Einfluss des iNKT TCR HV4 $\alpha$ auf die rCD1d Tetramerbindung	59
3.17	Einfluss des V-J Übergangs der iNKT TCR $\alpha$ Kette in der Ratte	60

3.18	Einfluss des V-J Übergangs auf die CD1d abhängige Aktivierung des iNKT TCR	61
3.19	Modellierung der iNKT TCR Interaktion mit CD1d: $\alpha$ GC in Maus und Mensch mit Fokus auf Aminosäure Position 93	62
3.20	Einfluss des V-J Übergangs der iNKT TCR $\alpha$ Kette in Maus und Mensch	62
3.21	Aminosäuresequenzen der verwendeten iNKT TCR $\beta$ Ketten der Ratte	62
3.22	Einfluss der iNKT TCR $\beta$ Kette in der Ratte	63
3.23	Expansion von Ratten iNKT Zellen <i>in vitro</i>	65
3.24	CDR2 $\alpha$ Sequenz expandierter iNKT Zellen	66
3.25	V-J Expression von <i>AV14</i> TCR $\alpha$ Ketten in primären Rattenzellen	67
3.26	Einfluss des V-J Übergangs der iNKT TCR $\alpha$ Kette in expandierten iNKT Zellen der Ratte auf die rCD1d Bindung	67
3.27	Einfluss des V-J Übergangs der iNKT TCR $\alpha$ Kette in expandierten iNKT Zellen der Ratte auf die rCD1d Bindung	67
3.28	Expression der iNKT TCR $\alpha$ Kette in BV8S4 positiven und negativen iNKT Zellen der Ratte	68
3.29	Ratten CD1d Bindung von BV8S4 positiven und negativen iNKT Zellen der Ratte	69
3.30	Maus CD1d Bindung von BV8S4 positiven und negativen iNKT Zellen der Ratte	70
3.31	<i>BV</i> Expression von BV8S4 positiven und negativen iNKT Zellen der Ratte	71
4.1	Modell der Dimerfärbung in Abhängigkeit der Beladung	78
4.2	Modell der iNKT TCR Interaktion von Maus und Ratte (Homologiemodell)	84
4.3	Homologiemodell der iNKT TCR Interaktion der Ratte mit Fokus auf Position 93 im CDR3 $\alpha$	86

# Tabellenverzeichnis

2.1	Liste der verwendeten Primer . . . . .	22
2.2	Liste der verwendeten Antikörper . . . . .	24
3.1	Übersicht über die verwendeten Detergenzien und deren Eigenschaften . . . . .	47
3.2	Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere der Ratte . . . . .	72
3.3	Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere der Maus . . . . .	72
3.4	Statistische Auswertung der Untersuchung der maximalen Bindung unterschiedlich beladener CD1d Dimere des Menschen . . . . .	73
3.5	Statistische Auswertung der Untersuchung von CDR2 $\alpha$ und HV4 $\alpha$ . . . . .	73
3.6	Statistische Auswertung der Untersuchung von BV Segment und CDR3 $\beta$ . . . . .	74

# Literaturverzeichnis

- [1] Lars Kjer-Nielsen, Onisha Patel, Alexandra J Corbett, Jérôme Le Nours, Bronwyn Meehan, Li-gong Liu, Mugdha Bhati, Zhenjun Chen, Lyudmila Kostenko, Rangsimma Reantragoon, Nicholas A Williamson, Anthony W Purcell, Nadine L Dudek, Malcolm J McConville, Richard A J O’Hair, George N Khairallah, Dale I Godfrey, David P Fairlie, Jamie Rossjohn, and James McCluskey. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*, 491(7426):717–23, Nov 2012. doi: 10.1038/nature11605.
- [2] Mariolina Salio, Jonathan D Silk, E Yvonne Jones, and Vincenzo Cerundolo. Biology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annu Rev Immunol*, 32:323–66, Mar 2014. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120243.
- [3] Annemieke de Jong, Victor Peña-Cruz, Tan-Yun Cheng, Rachael A Clark, Ildiko Van Rhijn, and D Branch Moody. CD1a-autoreactive T cells are a normal component of the human alphabeta T cell repertoire. *nature immunology*, 11(12):1102–1109, December 2010.
- [4] Ildiko Van Rhijn, Anne Kasmar, Annemieke de Jong, Stephanie Gras, Mugdha Bhati, Marieke E Doorenspleet, Niek de Vries, Dale I Godfrey, John D Altman, Wilco de Jager, Jamie Rossjohn, and D Branch Moody. A conserved human T cell population targets mycobacterial antigens presented by CD1b. *Nat Immunol*, 14(7):706–13, Jun 2013. doi: 10.1038/ni.2630.
- [5] John R Rodgers and Richard G Cook. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol*, 5(6):459–71, Jun 2005. doi: 10.1038/nri1635.
- [6] Erin J Adams. Lipid presentation by human CD1 molecules and the diverse T cell populations that respond to them. *Curr Opin Immunol*, 26:1–6, Feb 2014. doi: 10.1016/j.coi.2013.09.005.
- [7] F Calabi and C Milstein. The molecular biology of CD1. *Semin Immunol*, 12(6):503–9, Dec 2000. doi: 10.1006/smim.2000.0271.
- [8] Manfred Brigl and Michael B Brenner. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*, 22:817–90, 2004. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608.
- [9] Anne Kasmar, Ildiko Van Rhijn, and D Branch Moody. The evolved functions of CD1 during infection. *Curr Opin Immunol*, 21(4):397–403, Aug 2009. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.022.

- [10] A Bendelac, O Lantz, M E Quimby, J W Yewdell, J R Bennink, and R R Brutkiewicz. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*, 268(5212):863–5, May 1995.
- [11] T Kawano, J Cui, Y Koezuka, I Toura, Y Kaneko, K Motoki, H Ueno, R Nakagawa, H Sato, E Kondo, H Koseki, and M Taniguchi. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278(5343):1626–9, Nov 1997.
- [12] Jonathan D Silk, Mariolina Salio, James Brown, E Yvonne Jones, and Vincenzo Cerundolo. Structural and functional aspects of lipid binding by CD1 molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24: 369–95, 2008. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175359.
- [13] Z Zeng, A R Castaño, B W Segelke, E A Stura, P A Peterson, and I A Wilson. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science*, 277(5324): 339–45, Jul 1997.
- [14] Duarte C Barral and Michael B Brenner. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol*, 7(12):929–41, Dec 2007. doi: 10.1038/nri2191.
- [15] Dalam Ly and D Branch Moody. The CD1 size problem: lipid antigens, ligands, and scaffolds. *Cell Mol Life Sci*, Mar 2014. doi: 10.1007/s00018-014-1603-6.
- [16] Dapeng Zhou, Carlos Cantu, 3rd, Yuval Sagiv, Nicolas Schrantz, Ashok B Kulkarni, Xiaoyang Qi, Don J Mahuran, Carlos R Morales, Gregory A Grabowski, Kamel Benlagha, Paul Savage, Albert Bendelac, and Luc Teyton. Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science*, 303(5657):523–7, Jan 2004. doi: 10.1126/science.1092009.
- [17] Li Bai, Yuval Sagiv, Yang Liu, Stefan Freigang, Karl O A Yu, Luc Teyton, Steven A Porcelli, Paul B Savage, and Albert Bendelac. Lysosomal recycling terminates CD1d-mediated presentation of short and polyunsaturated variants of the NKT cell lipid antigen alphaGalCer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(25):10254–9, Jun 2009. doi: 10.1073/pnas.0901228106.
- [18] B J Fowlkes, A M Kruisbeek, H Ton-That, M A Weston, J E Coligan, R H Schwartz, and D M Pardoll. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature*, 329(6136):251–4, 1987. doi: 10.1038/329251a0.
- [19] M Sykes. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol*, 145(10):3209–15, Nov 1990.
- [20] H Koseki, K Imai, F Nakayama, T Sado, K Moriwaki, and M Taniguchi. Homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor alpha chain expanded in unprimed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(14):5248–52, Jul 1990.

- [21] O Lantz and A Bendelac. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*, 180(3):1097–106, Sep 1994.
- [22] P Dellabona, E Padovan, G Casorati, M Brockhaus, and A Lanzavecchia. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med*, 180(3):1171–6, Sep 1994.
- [23] M Exley, J Garcia, S P Balk, and S Porcelli. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med*, 186(1):109–20, Jul 1997.
- [24] K Benlagha and A Bendelac. CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 T cells: lymphocytes of innate immunity. *Semin Immunol*, 12(6):537–42, Dec 2000. doi: 10.1006/smim.2000.0276.
- [25] Albert Bendelac, Paul B Savage, and Luc Teyton. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 25:297–336, 2007. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- [26] Hui Yee Greenaway, Benedict Ng, David A Price, Daniel C Douek, Miles P Davenport, and Vanessa Venturi. NKT and MAIT invariant TCRA sequences can be produced efficiently by VJ gene recombination. *Immunobiology*, 218(2):213–24, Feb 2013. doi: 10.1016/j.imbio.2012.04.003.
- [27] Floor Weerkamp, Miranda R M Baert, Martijn H Brugman, Willem A Dik, Edwin F E de Haas, Trudi P Visser, Christianne J M de Groot, Gerard Wagemaker, Jacques J M van Dongen, and Frank J T Staal. Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood*, 107(8):3131–7, Apr 2006. doi: 10.1182/blood-2005-08-3412.
- [28] Rita Vicente, Louise Swainson, Sophie Marty-Grès, Stéphanie C De Barros, Sandrina Kinet, Valérie S Zimmermann, and Naomi Taylor. Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Semin Immunol*, 22(5):270–5, Oct 2010. doi: 10.1016/j.smim.2010.04.016.
- [29] Stephen J Turner, Peter C Doherty, James McCluskey, and Jamie Rossjohn. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(12):883–94, Dec 2006. doi: 10.1038/nri1977.
- [30] Jelena S Bezbradica, Timothy Hill, Aleksandar K Stanic, Luc Van Kaer, and Sebastian Joyce. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(14):5114–9, Apr 2005. doi: 10.1073/pnas.0408449102.
- [31] Takeshi Egawa, Gerard Eberl, Ichiro Taniuchi, Kamel Benlagha, Frederic Geissmann, Lothar Hennighausen, Albert Bendelac, and Dan R Littman. Genetic evidence supporting selection of

- the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*, 22(6):705–16, Jun 2005. doi: 10.1016/j.immuni.2005.03.011.
- [32] A Bendelac. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med*, 182(6):2091–6, Dec 1995.
- [33] Aleksandar K Stanic, A Dharshan De Silva, Jang-June Park, Venkataraman Sriram, Shinichi Ichikawa, Yoshio Hirabayashi, Kyoko Hayakawa, Luc Van Kaer, Randy R Brutkiewicz, and Sebastian Joyce. Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4):1849–54, Feb 2003. doi: 10.1073/pnas.0430327100.
- [34] Dapeng Zhou, Jochen Mattner, Carlos Cantu, 3rd, Nicolas Schrantz, Ning Yin, Ying Gao, Yuval Sagiv, Kelly Hudspeth, Yun-Ping Wu, Tadashi Yamashita, Susann Teneberg, Dacheng Wang, Richard L Proia, Steven B Levery, Paul B Savage, Luc Teyton, and Albert Bendelac. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*, 306(5702):1786–9, Dec 2004. doi: 10.1126/science.1103440.
- [35] Patrick J Brennan, Raju V V Tatituri, Manfred Brigl, Edy Y Kim, Amit Tuli, Joseph P Sanderson, Stephan D Gadola, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S Besra, and Michael B Brenner. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol*, Oct 2011. doi: 10.1038/ni.2143.
- [36] Federica Facciotti, Gundimeda S Ramanjaneyulu, Marco Lepore, Sebastiano Sansano, Marco Cavallari, Magdalena Kistowska, Sonja Forss-Petter, Guanghui Ni, Alessia Colone, Amit Singhal, Johannes Berger, Chengfeng Xia, Lucia Mori, and Gennaro De Libero. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat Immunol*, 13(5):474–80, May 2012. doi: 10.1038/ni.2245.
- [37] Lisa M Fox, Daryl G Cox, Jennifer L Lockridge, Xiaohua Wang, Xiuxu Chen, Louise Scharf, David L Trott, Rachel M Ndonge, Natacha Veerapen, Gurdyal S Besra, Amy R Howell, Mark E Cook, Erin J Adams, William H Hildebrand, and Jenny E Gumperz. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol*, 7(10):e1000228, Oct 2009. doi: 10.1371/journal.pbio.1000228.
- [38] Bo Pei, Anneliese O Speak, Dawn Shepherd, Terry Butters, Vincenzo Cerundolo, Frances M Platt, and Mitchell Kronenberg. Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. *J Immunol*, 186(3):1348–60, Feb 2011. doi: 10.4049/jimmunol.1001008.
- [39] Lisa Kain, Bill Webb, Brian L Anderson, Shenglou Deng, Marie Holt, Anne Constanzo, Meng Zhao, Kevin Self, Anais Teyton, Chris Everett, Mitchell Kronenberg, Dirk M Zajonc, Albert Ben-

- delac, Paul B Savage, and Luc Teyton. The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian alpha-Linked Glycosylceramides. *Immunity*, 41(4):543–54, Oct 2014. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.017.
- [40] Brian Chung, Ala Aoukaty, Jan Dutz, Cox Terhorst, and Rusung Tan. Signaling lymphocytic activation molecule-associated protein controls NKT cell functions. *J Immunol*, 174(6):3153–7, Mar 2005.
- [41] Klaus Griewank, Christine Borowski, Svend Rietdijk, Ninghai Wang, Aimee Julien, Datsen G Wei, Alusha A Mamchak, Cox Terhorst, and Albert Bendelac. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity*, 27(5):751–62, Nov 2007. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.020.
- [42] Kim E Nichols, Jamie Hom, Shun-You Gong, Arupa Ganguly, Cindy S Ma, Jennifer L Cannons, Stuart G Tangye, Pamela L Schwartzberg, Gary A Koretzky, and Paul L Stein. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med*, 11(3):340–5, Mar 2005. doi: 10.1038/nm1189.
- [43] Benoit Pasquier, Luo Yin, Marie-Claude Fondanèche, Francis Relouzat, Coralie Bloch-Queyrat, Nathalie Lambert, Alain Fischer, Geneviève de Saint-Basile, and Sylvain Latour. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med*, 201(5):695–701, Mar 2005. doi: 10.1084/jem.20042432.
- [44] Taehoon Chun, Michael J Page, Laurent Gapin, Jennifer L Matsuda, Honglin Xu, Hanh Nguyen, Hyung-Sik Kang, Aleksandar K Stanic, Sebastian Joyce, Walter A Koltun, Michael J Chorney, Mitchell Kronenberg, and Chyung-Ru Wang. CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med*, 197(7):907–18, Apr 2003. doi: 10.1084/jem.20021366.
- [45] Daniel G Pellicci, Adam P Uldrich, Konstantinos Kyparissoudis, Nadine Y Crowe, Andrew G Brooks, Kirsten J L Hammond, Stephané Sidobre, Mitchell Kronenberg, Mark J Smyth, and Dale I Godfrey. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol*, 33(7):1816–23, Jul 2003. doi: 10.1002/eji.200323894.
- [46] Romain Bedel, Richard Berry, Thierry Mallevaey, Jennifer L Matsuda, Jingjing Zhang, Dale I Godfrey, Jamie Rossjohn, John W Kappler, Philippa Marrack, and Laurent Gapin. Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1):E119–28, Jan 2014. doi: 10.1073/pnas.1320777110.



- [47] Jenny E Gumperz, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, and Michael B Brenner. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*, 195(5):625–36, Mar 2002.
- [48] Kamel Benlagha, Tim Kyin, Andrew Beavis, Luc Teyton, and Albert Bendelac. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*, 296(5567):553–5, Apr 2002.
- [49] Daniel G Pellicci, Kirsten J L Hammond, Adam P Uldrich, Alan G Baxter, Mark J Smyth, and Dale I Godfrey. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med*, 195(7):835–44, Apr 2002.
- [50] J L Matsuda, O V Naidenko, L Gapin, T Nakayama, M Taniguchi, C R Wang, Y Koezuka, and M Kronenberg. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*, 192(5):741–54, Sep 2000.
- [51] K J Hammond, D G Pellicci, L D Poulton, O V Naidenko, A A Scalzo, A G Baxter, and D I Godfrey. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol*, 167(3):1164–73, Aug 2001.
- [52] Damian Kovalovsky, Olisambu U Uche, Sonia Eladad, Robin M Hobbs, Woelsung Yi, Eric Alonzo, Kevin Chua, Maggie Eidson, Hye-Jung Kim, Jin S Im, Pier Paolo Pandolfi, and Derek B Sant’Angelo. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol*, 9(9):1055–64, Sep 2008. doi: 10.1038/ni.1641.
- [53] Adam K Savage, Michael G Constantinides, Jin Han, Damien Picard, Emmanuel Martin, Bofeng Li, Olivier Lantz, and Albert Bendelac. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, 29(3):391–403, Sep 2008. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.011.
- [54] Stuart P Berzins, Mark J Smyth, and Alan G Baxter. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2):131–42, Feb 2011. doi: 10.1038/nri2904.
- [55] M C Leite-De-Moraes, A Hameg, A Arnould, F Machavoine, Y Koezuka, E Schneider, A Herbelin, and M Dy. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol*, 163(11):5871–6, Dec 1999.
- [56] Runhua Hou, Olga Goloubeva, Donna S Neuberg, Jack L Strominger, and S Brian Wilson. Interleukin-12 and interleukin-2-induced invariant natural killer T-cell cytokine secretion and perforin expression independent of T-cell receptor activation. *Immunology*, 110(1):30–7, Sep 2003.

- [57] Emma C Reilly, Jack R Wands, and Laurent Brossay. Cytokine dependent and independent iNKT cell activation. *Cytokine*, 51(3):227–31, Sep 2010. doi: 10.1016/j.cyto.2010.04.016.
- [58] Manfred Brigl and Michael B Brenner. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin Immunol*, 22(2):79–86, Apr 2010. doi: 10.1016/j.smim.2009.10.006.
- [59] Emmanuel Tupin, Yuki Kinjo, and Mitchell Kronenberg. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 5(6):405–17, Jun 2007. doi: 10.1038/nr-micro1657.
- [60] Patrick J Brennan, Manfred Brigl, and Michael B Brenner. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*, 13(2):101–17, Feb 2013. doi: 10.1038/nri3369.
- [61] Marie-Laure Michel, Alexandre Castro Keller, Christophe Paget, Masakazu Fujio, François Trottein, Paul B Savage, Chi-Huey Wong, Elke Schneider, Michel Dy, and Maria C Leite-de Moraes. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med*, 204(5):995–1001, May 2007. doi: 10.1084/jem.20061551.
- [62] Jelena S Bezbradica, Aleksandar K Stanic, Naoto Matsuki, Helene Bour-Jordan, Jeffrey A Bluestone, James W Thomas, Derya Unutmaz, Luc Van Kaer, and Sebastian Joyce. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo. *J Immunol*, 174(8):4696–705, Apr 2005.
- [63] Shinji Oki, Asako Chiba, Takashi Yamamura, and Sachiko Miyake. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest*, 113(11):1631–40, Jun 2004. doi: 10.1172/JCI20862.
- [64] Ian F Hermans, Jonathan D Silk, Uzi Gileadi, Mariolina Salio, Bini Mathew, Gerd Ritter, Richard Schmidt, Adrian L Harris, Lloyd Old, and Vincenzo Cerundolo. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol*, 171(10):5140–7, Nov 2003.
- [65] S D Fugmann, A I Lee, P E Shockett, I J Villey, and D G Schatz. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*, 18:495–527, 2000. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.495.
- [66] Erin J Adams and Jacinto López-Sagaseta. The immutable recognition of CD1d. *Immunity*, 34(3):281–3, Mar 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.006.

- [67] Natalie A Borg, Kwok S Wun, Lars Kjer-Nielsen, Matthew C J Wilce, Daniel G Pellicci, Ruide Koh, Gurdyal S Besra, Mandvi Bharadwaj, Dale I Godfrey, James McCluskey, and Jamie Rossjohn. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*, 448(7149):44–9, Jul 2007. doi: 10.1038/nature05907.
- [68] James P Scott-Browne, Jennifer L Matsuda, Thierry Mallevaey, Janice White, Natalie A Borg, James McCluskey, Jamie Rossjohn, John Kappler, Philippa Marrack, and Laurent Gapin. Germline-encoded recognition of diverse glycolipids by natural killer T cells. *Nat Immunol*, 8(10):1105–13, Oct 2007. doi: 10.1038/ni1510.
- [69] Elwira Pyz, Olga Naidenko, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura, Ingolf Berberich, Susanna Cardell, Mitchell Kronenberg, and Thomas Herrmann. The Complementarity Determining Region 2 of BV8S2 (V b8.2) Contributes to Antigen Recognition by Rat Invariant NKT Cell TCR. *Journal of Immunology*, 176:7447–7455, 2006.
- [70] Thierry Mallevaey, James P Scott-Browne, Jennifer L Matsuda, Mary H Young, Daniel G Pellicci, Onisha Patel, Meena Thakur, Lars Kjer-Nielsen, Stewart K Richardson, Vincenzo Cerundolo, Amy R Howell, James McCluskey, Dale I Godfrey, Jamie Rossjohn, Philippa Marrack, and Laurent Gapin. T cell receptor CDR2 beta and CDR3 beta loops collaborate functionally to shape the iNKT cell repertoire. *Immunity*, 31(1):60–71, Jul 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.010.
- [71] Daniel G Pellicci, Onisha Patel, Lars Kjer-Nielsen, Siew Siew Pang, Lucy C Sullivan, Konstantinos Kyparissoudis, Andrew G Brooks, Hugh H Reid, Stephanie Gras, Isabelle S Lucet, Ruide Koh, Mark J Smyth, Thierry Mallevaey, Jennifer L Matsuda, Laurent Gapin, James McCluskey, Dale I Godfrey, and Jamie Rossjohn. Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity*, 31(1):47–59, Jul 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.018.
- [72] William C Florence, Chengfeng Xia, Laura E Gordy, Wenlan Chen, Yalong Zhang, James Scott-Browne, Yuki Kinjo, Karl O A Yu, Santosh Keshipeddy, Daniel G Pellicci, Onisha Patel, Lars Kjer-Nielsen, James McCluskey, Dale I Godfrey, Jamie Rossjohn, Stewart K Richardson, Steven A Porcelli, Amy R Howell, Kyoko Hayakawa, Laurent Gapin, Dirk M Zajonc, Peng George Wang, and Sebastian Joyce. Adaptability of the semi-invariant natural killer T-cell receptor towards structurally diverse CD1d-restricted ligands. *EMBO J*, 28(23):3781, Dec 2009. doi: 10.1038/emboj.2009.348.
- [73] Thierry Mallevaey, Andrew J Clarke, James P Scott-Browne, Mary H Young, Laila C Roisman, Daniel G Pellicci, Onisha Patel, Julian P Vivian, Jennifer L Matsuda, James McCluskey, Dale I Godfrey, Philippa Marrack, Jamie Rossjohn, and Laurent Gapin. A Molecular Ba-

sis for NKT Cell Recognition of CD1d-Self-Antigen. *Immunity*, 34(3):315–26, Mar 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.01.013.

- [74] Gediminas Matulis, Joseph P Sanderson, Nikolai M Lissin, Maria B Asparuhova, Gopal R Bommini, Daniel Schümperli, Richard R Schmidt, Peter M Villiger, Bent K Jakobsen, and Stephan D Gadola. Innate-like control of human iNKT cell autoreactivity via the hypervariable CDR3beta loop. *PLoS Biol*, 8(6):e1000402, 2010. doi: 10.1371/journal.pbio.1000402.
- [75] Joseph P Sanderson, Kathrin Waldburger-Hauri, Diana Garzón, Gediminas Matulis, Salah Mansour, Nicholas J Pumphrey, Nikolai Lissin, Peter M Villiger, Bent Jakobsen, José D Faraldo-Gómez, and Stephan D Gadola. Natural variations at position 93 of the invariant Valpha24-Jalpha18 alpha chain of human iNKT-cell TCRs strongly impact on CD1d binding. *Eur J Immunol*, 42(1):248–55, Jan 2012. doi: 10.1002/eji.201141956.
- [76] Yali Li, Enrico Girardi, Jing Wang, Esther Dawen Yu, Gavin F. Painter, Mitchell Kronenberg, and Dirk M. Zajonc. The Valpha14 invariant natural killer T cell TCR forces microbial glycolipids and CD1d into a conserved binding mode. *JEM*, 207:2383–2393, October 2010.
- [77] Kwok S Wun, Garth Cameron, Onisha Patel, Siew Siew Pang, Daniel G Pellicci, Lucy C Sullivan, Santosh Keshipeddy, Mary H Young, Adam P Uldrich, Meena S Thakur, Stewart K Richardson, Amy R Howell, Petr A Illarionov, Andrew G Brooks, Gurdyal S Besra, James McCluskey, Laurent Gapin, Steven A Porcelli, Dale I Godfrey, and Jamie Rossjohn. A Molecular Basis for the Exquisite CD1d-Restricted Antigen Specificity and Functional Responses of Natural Killer T Cells. *Immunity*, 34(3):327–39, Mar 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.001.
- [78] Elisa Monzon-Casanova, Daniel Paletta, Lisa Starick, Ingrid Müller, Derek B Sant’Angelo, Elwira Pyz, and Thomas Herrmann. Direct identification of rat iNKT cells reveals remarkable similarities to human iNKT cells and a profound deficiency in LEW rats. *Eur J Immunol*, 43(2):404–15, Feb 2013. doi: 10.1002/eji.201242565.
- [79] Elisa Monzon-Casanova. *Rat iNKT cells: Phenotype and function*. PhD thesis, Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie, 2010.
- [80] S Ichimiya, K Kikuchi, and A Matsuura. Structural analysis of the rat homologue of CD1. Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells. *J Immunol*, 153(3):1112–23, Aug 1994.
- [81] S Katabami, A Matsuura, H Z Chen, K Imai, and K Kikuchi. Structural organization of rat CD1 typifies evolutionarily conserved CD1D class genes. *Immunogenetics*, 48(1):22–31, Jun 1998.

- [82] Elisa Monzon-Casanova, Birte Steiniger, Stefanie Schweigle, Holger Clemen, Daniela Zdziebło, Lisa Starick, Ingrid Müller, Chyung-Ru Wang, Sara Rhost, Susanna Cardell, Elwira Pyz, and Thomas Herrmann. CD1d expression in paneth cells and rat exocrine pancreas revealed by novel monoclonal antibodies which differentially affect NKT cell activation. *PLoS One*, 5(9), 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0013089.
- [83] Akihiro Matsuura, Miyuki Kinebuchi, Hong-Zhi Chen, Shigeo Katabami, Tadakazu Shimizu, Yuji Hashimoto, Kokichi Kikuchi, and Noriyuki Sato. NKT Cells in the Rat: organ-specific Distribution of NKT Cells expressing distinct Valpha14 chains. *The Journal of Immunology*, 164:3140–3148, 2000.
- [84] Miyuki Kinebuchi and Akihiro Matsuura. Rat T-cell receptor TRAV11 (Valpha14) genes: further evidence of extensive multiplicity with homogeneous CDR1 and diversified CDR2 by genomic contig and cDNA analysis. *Immunogenetics*, 55(11):756–62, Feb 2004. doi: 10.1007/s00251-003-0640-3.
- [85] A Asmuss, K Hofmann, T Hochgrebe, G Giegerich, T Hünig, and T Herrmann. Alleles of highly homologous rat T cell receptor beta-chain variable segments 8.2 and 8.4: strain-specific expression, reactivity to superantigens, and binding of the mAb R78. *J Immunol*, 157(10):4436–41, Nov 1996.
- [86] K Benlagha, A Weiss, A Beavis, L Teyton, and A Bendelac. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med*, 191(11):1895–903, Jun 2000.
- [87] Jens Schümann, Roger B Voyle, Bing-Yuan Wei, and H Robson MacDonald. Cutting edge: influence of the TCR V beta domain on the avidity of CD1d:alpha-galactosylceramide binding by invariant V alpha 14 NKT cells. *J Immunol*, 170(12):5815–9, Jun 2003.
- [88] F Letourneur and B Malissen. Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. *Eur J Immunol*, 19(12):2269–74, Dec 1989. doi: 10.1002/eji.1830191214.
- [89] Fred Lühder, Yun Huang, Kevin M Dennehy, Christine Guntermann, Ingrid Müller, Erna Winkler, Thomas Kerkau, Shinji Ikemizu, Simon J Davis, Thomas Hanke, and Thomas Hünig. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med*, 197(8):955–66, Apr 2003. doi: 10.1084/jem.20021024.
- [90] V T Oi, S L Morrison, L A Herzenberg, and P Berg. Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(3):825–9, Feb 1983.

- [91] Yang Liu, Randal D Goff, Dapeng Zhou, Jochen Mattner, Barbara A Sullivan, Archana Khurana, Carlos Cantu, 3rd, Eugene V Ravkov, Chris C Ibegbu, John D Altman, Luc Teyton, Albert Bendelac, and Paul B Savage. A modified alpha-galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells. *J Immunol Methods*, 312(1-2):34–9, May 2006. doi: 10.1016/j.jim.2006.02.009.
- [92] Jin S Im, Pooja Arora, Gabriel Bricard, Alberto Molano, Manjunatha M Venkataswamy, Ian Baine, Elliot S Jerud, Michael F Goldberg, Andres Baena, Karl O A Yu, Rachel M Ndonge, Amy R Howell, Weiming Yuan, Peter Cresswell, Young-Tae Chang, Petr A Illarionov, Gurdyal S Besra, and Steven A Porcelli. Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation. *Immunity*, 30(6):888–98, Jun 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.022.
- [93] M Knödel, A W Kuss, D Lindemann, I Berberich, and A Schimpl. Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur J Immunol*, 29(9):2988–98, Sep 1999.
- [94] Y Soneoka, P M Cannon, E E Ramsdale, J C Griffiths, G Romano, S M Kingsman, and A J Kingsman. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, 23(4):628–33, Feb 1995.
- [95] D Lindemann, E Patriquin, S Feng, and R C Mulligan. Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol Med*, 3(7):466–76, Jul 1997.
- [96] T Pietschmann, M Heinkelein, M Heldmann, H Zentgraf, A Rethwilm, and D Lindemann. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*, 73(4):2613–21, Apr 1999.
- [97] Joseph Dal Potro, Teit Eliot Johansen, Branimir Catipovic, Donna Jo Parfit, Dave Tuveson, Ulrik Gether, Steve Kozlowski, Douglas T Fearon, and Jonathan P Schneck. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90:6671–6675, Jul 1993.
- [98] T Hebell, J M Ahearn, and D T Fearon. Suppression of the immune response by a soluble complement receptor of B lymphocytes. *Science*, 254(5028):102–5, Oct 1991.
- [99] H Büeler and R C Mulligan. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and B7-1. *Mol Med*, 2(5):545–55, Sep 1996.
- [100] Matthias Kreiss, Anne Asmuss, Kathrin Krejci, Dirk Lindemann, Tohru Miyoshi-Akiyama, Takehiko Uchiyama, Lothar Rink, Chris P M Broeren, and Thomas Herrmann. Contrasting contributions of complementarity-determining region 2 and hypervariable region 4 of rat BV8S2+

- (Vbeta8.2) TCR to the recognition of myelin basic protein and different types of bacterial superantigens. *Int Immunol*, 16(5):655–63, May 2004. doi: 10.1093/intimm/dxh068.
- [101] L R Smith, D H Kono, and A N Theofilopoulos. Complexity and sequence identification of 24 rat V beta genes. *J Immunol*, 147(1):375–9, Jul 1991.
- [102] James E East, Wenji Sun, and Tonya J Webb. Artificial antigen presenting cell (aAPC) mediated activation and expansion of natural killer T cells. *J Vis Exp*, (70), 2012. doi: 10.3791/4333.
- [103] Johannes Weirather, Ulrich D W Hofmann, Niklas Beyersdorf, Gustavo C Ramos, Benjamin Vogel, Anna Frey, Georg Ertl, Thomas Kerkau, and Stefan Frantz. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res*, 115(1):55–67, Jun 2014. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303895.
- [104] Stephan D Gadola, Anastasios Karadimitris, Nathan R Zaccai, Mariolina Salio, Nicolas Dulphy, Dawn Shepherd, E Yvonne Jones, and Vincenzo Cerundolo. Generation of CD1 tetramers as a tool to monitor glycolipid-specific T cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1433):875–7, May 2003. doi: 10.1098/rstb.2003.1267.
- [105] J Dal Porto, T E Johansen, B Catipović, D J Parfiit, D Tuveson, U Gether, S Kozłowski, D T Fearon, and J P Schneck. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14):6671–5, Jul 1993.
- [106] Michael S Lebowitz, Sean O’Herrin, Abdel-Rahim A Hamad, Tarek Fahmy, Didier Marguet, Nicholas C Barnes, Drew Pardoll, Joan G Bieler, and Jonathan P Schneck. Soluble, High-Affinity Dimers of T-Cell Receptors and Class II Major Histocompatibility Complexes: Biochemical Probes for Analysis and Modulation of Immune Responses. *Cellular Immunology*, 192:175–184, 1999.
- [107] J P Schneck, J E Slansky, S M O’Herrin, and T F Greten. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 17:Unit 17.2, May 2001. doi: 10.1002/0471142735.im1702s35.
- [108] Corinna McCarthy, Dawn Shepherd, Sebastian Fleire, Victoria S Stronge, Michael Koch, Petr A Illarionov, Giovanna Bossi, Mariolina Salio, Galit Denkberg, Faye Reddington, Andrea Tarlton, B Gopal Reddy, Richard R Schmidt, Yoram Reiter, Gillian M Griffiths, P Anton van der Merwe, Gurdyal S Besra, E Yvonne Jones, Facundo D Batista, and Vincenzo Cerundolo. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med*, 204(5):1131–44, May 2007. doi: 10.1084/jem.20062342.

- [109] Stefan Freigang, Elise Landais, Victoria Zadorozhny, Lisa Kain, Kenji Yoshida, Yang Liu, Shenglou Deng, Wulf Palinski, Paul B Savage, Albert Bendelac, and Luc Teyton. Scavenger receptors target glycolipids for natural killer T cell activation. *J Clin Invest*, 122(11):3943–54, Nov 2012. doi: 10.1172/JCI62267.
- [110] Daniel G Pellicci, Adam P Uldrich, Jérôme Le Nours, Fiona Ross, Eric Chabrol, Sidonia B G Eckle, Renate de Boer, Ricky T Lim, Kirsty McPherson, Gurdyal Besra, Amy R Howell, Lorenzo Moretta, James McCluskey, Mirjam H M Heemskerk, Stephanie Gras, Jamie Rossjohn, and Dale I Godfrey. The molecular bases of delta/alphabeta T cell-mediated antigen recognition. *J Exp Med*, 211(13):2599–615, Dec 2014. doi: 10.1084/jem.20141764.
- [111] A Matsuura, M Kinebuchi, H Z Chen, S Katabami, T Shimizu, Y Hashimoto, K Kikuchi, and N Sato. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains. *J Immunol*, 164(6):3140–8, Mar 2000.
- [112] Bee-Cheng Sim, Kaisa Holmberg, Stephane Sidobre, Olga Naidenko, Nathalie Niederberger, Shanne D Marine, Mitchell Kronenberg, and Nicholas R J Gascoigne. Surprisingly minor influence of TRAV11 (Valpha14) polymorphism on NK T-receptor mCD1/alpha-galactosylceramide binding kinetics. *Immunogenetics*, 54(12):874–83, Mar 2003. doi: 10.1007/s00251-002-0532-y.
- [113] Kwok S Wun, Natalie A Borg, Lars Kjer-Nielsen, Travis Beddoe, Ruide Koh, Stewart K Richardson, Meena Thakur, Amy R Howell, James P Scott-Browne, Laurent Gapin, Dale I Godfrey, James McCluskey, and Jamie Rossjohn. A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR. *J Exp Med*, 205(4):939–49, Apr 2008. doi: 10.1084/jem.20072141.
- [114] H Koseki, H Asano, T Inaba, N Miyashita, K Moriwaki, K F Lindahl, Y Mizutani, K Imai, and M Taniguchi. Dominant expression of a distinctive V14+ T-cell antigen receptor alpha chain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17):7518–22, Sep 1991.
- [115] M Shimamura, T Ohteki, P Launois, A M Garcia, and H R MacDonald. Thymus-independent generation of NK1+ T cells in vitro from fetal liver precursors. *J Immunol*, 158(8):3682–9, Apr 1997.
- [116] M Shimamura, J Miura-Ohnuma, and Y Y Huang. Major sites for the differentiation of V alpha 14(+) NKT cells inferred from the V-J junctional sequences of the invariant T-cell receptor alpha chain. *Eur J Biochem*, 268(1):56–61, Jan 2001.
- [117] Jens Schümann, Roger B Voyle, Bing-Yuan Wei, and H Robson Macdonald. Cutting Edge: Influence of the TCR Vbeta Domain on the Avidity of CD1d: alpha -Galactosylceramide Binding by Invariant Valpha 14 NKT Cells. *Journal of Immunology*, 170:5815–5819, 2003.



- [118] Jens Schümann, Marcin P Mycko, Paolo Dellabona, Giulia Casorati, and H Robson MacDonald. Cutting edge: influence of the TCR Vbeta domain on the selection of semi-invariant NKT cells by endogenous ligands. *J Immunol*, 176(4):2064–8, Feb 2006.
- [119] Gediminas Matulis, Joseph P Sanderson, Nikolai M Lissin, Maria B Asparuhova, Gopal R Bommineni, Daniel Schümperli, Richard R Schmidt, Peter M Villiger, Bent K Jakobsen, and Stephan D Gadola. Innate-like control of human iNKT cell autoreactivity via the hypervariable CDR3beta loop. *PLoS Biol*, 8(6):e1000402, 2010. doi: 10.1371/journal.pbio.1000402.
- [120] Stéphane Sidobre and Mitchell Kronenberg. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Methods*, 268(1):107–21, Oct 2002.
- [121] Michael Koch, Victoria S Stronge, Dawn Shepherd, Stephan D Gadola, Bini Mathew, Gerd Ritter, Alan R Fersht, Gurdyal S Besra, Richard R Schmidt, E Yvonne Jones, and Vincenzo Cerundolo. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat Immunol*, 6(8):819–26, Aug 2005. doi: 10.1038/ni1225.
- [122] Joyce Rauch, Jenny Gumperz, Cheryl Robinson, Markus Sköld, Chris Roy, David C Young, Michel Lafleur, D Branch Moody, Michael B Brenner, Catherine E Costello, and Samuel M Behar. Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. *J Biol Chem*, 278(48):47508–15, Nov 2003. doi: 10.1074/jbc.M308089200.
- [123] Takayuki Shiratsuchi, Jonathan Schneck, Akira Kawamura, and Moriya Tsuji. Human CD1 dimeric proteins as indispensable tools for research on CD1-binding lipids and CD1-restricted T cells. *J Immunol Methods*, 345(1-2):49–59, Jun 2009. doi: 10.1016/j.jim.2009.04.002.
- [124] Vincent Lombardi, Philippe Stock, Abinav K Singh, Jerome Kerzerho, Wen Yang, Barbara A Sullivan, Xiangming Li, Takayuki Shiratsuchi, Nathan E Hnatiuk, Amy R Howell, Karl O A Yu, Steven A Porcelli, Moriya Tsuji, Mitchell Kronenberg, S Brian Wilson, and Omid Akbari. A CD1d-dependent antagonist inhibits the activation of invariant NKT cells and prevents development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol*, 184(4):2107–15, Feb 2010. doi: 10.4049/jimmunol.0901208.
- [125] Carlos Cantu, 3rd, Kamel Benlagha, Paul B Savage, Albert Bendelac, and Luc Teyton. The paradox of immune molecular recognition of alpha-galactosylceramide: low affinity, low specificity for CD1d, high affinity for alpha beta TCRs. *J Immunol*, 170(9):4673–82, May 2003.
- [126] D P Gold, C D Surh, K S Sellins, K Schroder, J Sprent, and D B Wilson. Rat T cell responses to superantigens. II. Allelic differences in V beta 8.2 and V beta 8.5 beta chains determine respon-

- siveness to staphylococcal enterotoxin B and mouse mammary tumor virus-encoded products. *J Exp Med*, 179(1):63–9, Jan 1994.
- [127] M Stienekemeier, K Hofmann, R Gold, and T Herrmann. A polymorphism of the rat T-cell receptor beta-chain variable gene 13 (BV13S1) correlates with the frequency of BV13S1-positive CD4 cells. *Immunogenetics*, 51(4-5):296–305, Apr 2000.
- [128] T Hünig, N Torres-Nagel, B Mehling, H J Park, and T Herrmann. Thymic development and repertoire selection: the rat perspective. *Immunol Rev*, 184:7–19, Dec 2001.
- [129] Katie Tungatt, Valentina Bianchi, Michael D Crowther, Wendy E Powell, Andrea J Schauenburg, Andrew Trimby, Marco Donia, John J Miles, Christopher J Holland, David K Cole, Andrew J Godkin, Mark Peakman, Per Thor Straten, Inge Marie Svane, Andrew K Sewell, and Garry Dolton. Antibody stabilization of peptide-MHC multimers reveals functional T cells bearing extremely low-affinity TCRs. *J Immunol*, 194(1):463–74, Jan 2015. doi: 10.4049/jimmunol.1401785.

# Abkürzungsverzeichnis

$\infty$	Unendlich
$\emptyset$	Durchmesser
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
<b>A</b>	Adenin
<b>A</b>	Alanin
<b>AA</b>	Acrylamid
<b>AB</b>	Antibiotikum
<b>Abb</b>	Abbildung
$\alpha\text{GC}$	$\alpha$ -Galactosylceramid
<b>Ala</b>	Alanin
<b>APC</b>	Antigenpräsentierende Zellen
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>Asn</b>	Asparagin
<b>Asp</b>	Asparaginsäure
<b>ATV</b>	Antibiotic-Trypsin-Versene
$\beta_2\text{M}$	$\beta_2$ Microglobulin
<b>BCR</b>	B Zellrezeptor
<b>Bio</b>	Biotin
<b>BM</b>	Knochenmark
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>BSS</b>	Buffered sodium salts
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cystein
<b>C</b>	Cytosin

<b>c</b>	Konzentration
<b>ca.</b>	circa
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>CDR</b>	Complementarity-Determining Region
<b>CLIP</b>	Class II-associated Ii peptides
<b>CLP</b>	Gemeinsame Lymphoide VOrläufer
<b>cm</b>	Centimeter ( $10^{-2}$ Meter)
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>ConA</b>	Concanavalin A
<b>CTL</b>	zytotoxische T Lymphozyten
<b>Cy5</b>	Cyanine5
<b>Cys</b>	Cystein
<b>D</b>	
	Asparaginsäure
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>dCTP</b>	Desoxycytidintriphosphat
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>dGTP</b>	Desoxyguanosintriphosphat
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DN</b>	Doppelnegative T Zelle
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DP</b>	Doppelpositive T Zelle
<b>dTTP</b>	Desoxythymidintriphosphat
<b>E</b>	
	Glutaminsäure
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

<b>ER</b>	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	und andere
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>F</b>	Phenylalanin
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FL</b>	Fluoreszenz
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>fwd</b>	forward
<b>G</b>	Glycin
<b>G</b>	Guanin
<b>g</b>	Gramm
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein
<b>Gln</b>	Glutamin
<b>Glu</b>	Glutaminsäure
<b>Gly</b>	Glycin
<b>GM</b>	Geometric Mean
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>H</b>	Hsitidin
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Schwefelsäure
<b>HAT</b>	Hypozanthine-Aminopterin-Thymidine
<b>HBS</b>	HEPES gepufferte Salzlösung
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>His</b>	Hsitidin
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigen
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>HV</b>	Hypervariable Region

<b>I</b>	Isoleucin
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>iG3b</b>	Isoglobotrihexosylceramid
<b>IHL</b>	Intrahepatische Lymphozyten
<b>li</b>	Invariante Kette
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Ile</b>	Isoleucin
<b>iNKT Zelle</b>	Invariante Natürliche Killer T Zelle
<b>IRES</b>	Internal Ribosomal Entry Signal
<b>ISP</b>	Intermediäres Einzelpositivstadium
<b>ITAM</b>	Immunrezeptor Tyrosinbasierte Aktivierungsmotive
<b>K</b>	Lysin
<b>k</b>	Kilo- ( $10^3$ )
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
$\lambda$	Wellenlänge
<b>L</b>	Leucin
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Lysogeny Broth
<b>LDLR</b>	Low Density Lipoprotein Rezeptor
<b>Leu</b>	Leucin
<b>LTP</b>	Lipid-Transfer Proteine
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>Lys</b>	Lysin
<b>M</b>	molare Masse
<b>M</b>	Methionin
<b>m</b>	Milli- ( $10^{-3}$ )
<b>m</b>	Masse
<b>MAIT</b>	Mukosa assoziierte invariante T Zellen
<b>max.</b>	maximal
$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )

<b>Met</b>	Methionin
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesiumsulfat
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>min</b>	Minute
<b>MPP</b>	Multipotente Vorläufer
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MTP</b>	Microsomales Transferprotein
<b>N</b>	Asparagin
<b>n</b>	Nano- ( $10^{-9}$ )
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Natriumcarbonat
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Natriumhydrogenphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Natriumdihydrogenphosphat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Natriumazid
<b>NK Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NKT Zellen</b>	Natürlichen Killer T Zellen
<b>o.n.</b>	über Nacht
<b>Orient.</b>	Orientierung
<b>P</b>	Prolin
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PE</b>	R-Phycoerythrin
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>pH</b>	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>PLZF</b>	promyelocytic leukemia zinc finger
<b>Pro</b>	Prolin
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor

<b>Q</b>	Glutamin
<b>R</b>	Arginin
<b>rcf</b>	Relative centrifugal force
<b>rev</b>	reverse
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Rounds per minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RSS</b>	Recombination Signal Sequences
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>S</b>	Serin
<b>SC</b>	Supplement Complement
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>sek</b>	Sekunde
<b>Ser</b>	Serin
<b>SOB</b>	Super Optimal Broth
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>T</b>	Threonin
<b>T</b>	Thymin
<b>Tab</b>	Tabelle
<b>TAC</b>	Tris-Ammoniumchlorid
<b>TBE</b>	TRIS-Borat-EDTA
<b>TCR</b>	T Zellrezeptor
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TGS</b>	Tris-Glycin-SDS
<b>T<sub>H</sub></b>	T Helferzellen
<b>Thr</b>	Threonin
<b>T<sub>M</sub></b>	Schmelztemperatur
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptoren



<b>T<sub>Reg</sub></b>	Regulatorische T Zellen
<b>Tris</b>	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>U</b>	Units
<b>unkonj.</b>	unkonjugiert
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Valin
<b>v</b>	Volumen
<b>Val</b>	Valin
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>W</b>	Tryptophan
<b>Y</b>	Tyrosin



# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation ‚Die Variabilität des Ratten iNKT TCR‘ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 8. April 2015.....

(Daniel Paletta)

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled ‚The variability of the rat iNKT TCR‘ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 8. April 2015.....

(Daniel Paletta)

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Daniel Paletta  
Geburtsdatum: 12.12.1985  
Geburtsort: Augsburg

## Kontaktdaten

Adresse: Institut für Virologie und Immunbiologie  
Versbacher Straße 7  
97078 Würzburg  
Telefon: +49 (0)931-31-81801  
eMail: daniel.paletta@uni-wuerzburg.de

## Ausbildung

Promotion: Graduate School of Life Sciences seit 01/2012  
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
Institut für Virologie und Immunbiologie  
Diplom: Julius-Maximilians-Universität, Würzburg 10/2006 - 05/2011  
Note: 1,0  
Abitur: Gymnasium bei St. Anna, Augsburg 09/1996 - 06/2005  
Note: 2,2

## Publikationen

The variability of rat iNKT TCR demonstrates modulation of CD1d-glycolipid binding by hypervariable region 4 (HV4) and position 93 of the  $\alpha$  chain  
*Paletta, D. and Fichtner, AS. and Hahn, A. and Starick, L. and Beyersdorf, N.*

and Monzon-Casanova, E. and Mueller, TD. and Herrmann, T.

European Journal of Immunology, accepted April 2015

Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis

*Inuma, C. and Waki, M. and Kawakami, A. and Yamaguchi, M. and Tomaru, U.*

*and Sasaki, N. and Masuda, S. and Matsui, Y. and Iwasaki, S. and Baba, T.*

*and Kasahara, M. and Yoshiki, T. and **Paletta, D.** and Herrmann, T. and Ishizu, A.*

International Immunology, Vol. 27, p.105-114, Feb 2015

Direct identification of rat iNKT cells reveals remarkable similarities to human iNKT cells and a profound deficiency in LEW rats

*Monzon-Casanova, E. and **Paletta, D.** and Starick, L. and Müller, I. and*

*Sant'angelo, DB. and Pysz, E. and Herrmann, T*

European Journal of Immunology, Vol. 43, p.404-415, Feb 2013

### **Förderungen und Stipendien**

Kongressreiseförderung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) zur Teilnahme an der 44. Jahrestagung der DGfI, 2014 in Bonn

Kongressreiseförderung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes zur Teilnahme am 7. Symposium über CD1 und NKT Zellen, 2013 in Tours, Frankreich

### **Kongressteilnahmen**

*44. Jahrestagung der DGfI* in Bonn 17-20/09/2014

Poster: The Variability of the Rat iNKT TCR

*Translational Immunology II - From Target to Therapy* in Würzburg 11-12/04/2014

Poster: The Variability of the Rat iNKT TCR

*7th Symposium on CD1 and NKT cells* in Tours, Frankreich 13-17/09/2013

Poster: The Variability of the Rat iNKT TCR

*Translational Immunology - From Target to Therapy* in Würzburg 21-22/03/2013  
Poster: The Diversity of the iNKT TCR in Rats

*EPOS (7th International GSLS Symposium)* in Würzburg 16-17/10/2012  
Poster: Diversity of the iNKT TCR

### **Weitere Aktivitäten**

Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde 23-27/07/2012  
Mitglied bei der Deutschen Gesellschaft für Immunologie e.V. seit 10/12/2011

### **Sprachen**

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: Fließend in Wort und Schrift  
Spanisch: Grundkenntnisse (DELE nivel intermedio, Instituto Cervantes)

Würzburg, 8. April 2015 .....

(Daniel Paletta)

# Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof Dr. Thomas Herrmann. Für die Möglichkeit, dieses Thema im Zuge meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, für die zahllosen hilfreichen Diskussionen, für die Ermutigung und all die wertvolle Unterstützung.

Herzlichen Dank auch an meine Betreuer, Herrn Prof. Dr. Thomas Müller und Herrn Prof. Dr. Manfred Lutz, für all ihre Unterstützung und die wertvollen Diskussionen in den letzten Jahren.

Vielen Dank an dieser Stelle auch an Prof. Dr. Thomas Hünig, für seine wertvolle Unterstützung und die Möglichkeit der Teilnahme am GP Immunomodulation.

Ein sehr großer Dank geht natürlich auch an alle, mit denen ich in den letzten Jahren arbeiten durfte. Besonders an Lisa, Elisa, Mohindar, Alina, Anne und Felipe. Ihr habt sehr viel dazu beigetragen, dass es eine schöne Zeit war!

Die letzten Zeilen möchte ich gerne meiner Familie und meinen Freunden widmen, ohne deren Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre. Besonders meiner Mutter, die mir alles ermöglicht hat! Claudia, die mich schon so lange erträgt und immer für mich da ist. Und natürlich allen, die mich in dieser Zeit begleitet haben...

...danke!