

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Thomas Hünig

Funktionelle Analyse der Antigen- und Superantigenpräsentation
durch
MHC-Klasse-II-Moleküle der LEW-Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Henry Dlaske
aus Berlin

Würzburg, Februar 2008

Referent: Prof. Dr. Thomas Herrmann, Institut für Virologie und
Immunbiologie der Universität Würzburg

Koreferent: Privatdozent Dr. Christoph Otto, Experimentelle Transplantations-
Immunologie, Chirurgische Klinik des Universitätsklinikums
Würzburg

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2008

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Bestandteile des Immunsystems	1
1.2 Das unspezifische Immunsystem	1
1.3 Zelluläre und humorale spezifische Abwehr	1
1.4 Der T-Zellrezeptor	3
1.5 Der MHC	4
1.6 Interaktion zwischen TZR und Peptid-MHC-Molekül-Komplex	7
1.7 Superantigene	7
1.8 Bakterielle Superantigene und Interaktion mit TZR und MHC-Klasse-II-Molekül	8
1.9 Virale Superantigene	11
1.10 Superantigene und Krankheit	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2 Reagenzkits	17
2.1.3 Enzyme und Inhibitoren	18
2.1.4 Antikörper	18
2.1.5 Chemikalien	19
2.1.6 Nährmedien	20
2.1.7 Puffer und Lösungen	21
2.1.8 Versuchstiere	23
2.1.9 Zelllinien	23
2.1.10 Bakterienstämme	24
2.1.11 Primer	24
2.1.12 Bakterielle Superantigene	25
2.1.13 Antigene	25
2.1.14 Vektoren (Plasmide)	25
2.1.15 Marker	26
2.2 Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1 Restriktionsspaltung	27
2.2.2 DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese	27
2.2.3 Elution von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.4 Transformation	28

2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.2.5.1 Anlage einer Vorkultur	28
2.2.5.2 Großpräparation von Plasmid-DNA	29
2.2.5.3 Analytische Präparation von Plasmid-DNA	29
2.2.6 Klonierungen	29
2.2.6.1 Vorbereiten des Vektors	29
2.2.6.2 Vorbereiten des Inserts	30
2.2.6.3 Ligation	30
2.2.7 RNA-Extraktion aus Zellkulturen	30
2.2.8 PCR	31
2.2.9 RT-PCR	32
2.2.10 Sequenzierung	33
2.2.11 Transduktion von Genen in eukaryontische Zellen	34
2.2.11.1 Kalziumphosphatpräzipitation	34
2.2.11.2 Retroviraler Gentransfer	35
2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	36
2.2.13 Western Blot	37

2.3 Zellbiologische Methoden	38
2.3.1 Kultivierung von Zellen	38
2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.3.3 Erstellen von Zellsuspensionen	39
2.3.4 Stimulation des 53.4-T-Zellhybridoms durch immobilisierte Antikörper	39
2.3.5 Behandlung von Zellen mit Mitomycin C	39
2.3.6 Selektion transfizierter Zellen mit Geneticin (G418)	40
2.3.7 Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Gradient	40
2.3.8 Stimulation von Lymphknotenzellen durch Superantigene/Mitogene	40
2.3.8.1 Bakterielle Superantigene	40
2.3.8.2 Virale Superantigene	41
2.3.8.3 Concanavalin A (ConA)	42
2.3.8.4 Lipopolysaccharid (LPS)	42
2.3.9 Stimulation von T-Zellhybridomen	42
2.3.9.1 Bakterielle Superantigene	42
2.3.9.2 Virale Superantigene	42
2.3.9.3 gpMBP	43
2.3.9.4 L.casein	43
2.3.9.5 Phorbolmyristataacetat (PMA) und Ionomycin	43
2.3.10 ELISA	43
2.3.11 Anreicherung dendritischer Zellen im Metrizamid-Gradienten	44

2.3.12 Grenzverdünnung (limited dilution)	45
2.3.13 Anreicherung von T-Zellen	45
2.3.13.1 Nylonwollsäulenpassage	45
2.3.13.2 Panning	45
2.3.14 In-vivo-Stimulation durch virale Superantigene	46
2.3.15 Durchflusszytometrie	46
2.3.15.1 Analyse von Oberflächenantigenen	47
2.3.15.2 Analyse intrazellulärer Proteine	48
2.3.15.3 Anreicherung von Zellpopulationen durch FACSort	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Präsentation von Antigenen und Superantigenen durch LEW-MHC-	
 Klasse-II-Moleküle	49
3.1.1 Die Stimulation gereinigter T-Zellen durch die untersuchten bakteriellen Sag ist abhängig von der Anwesenheit Antigen-präsentierender Zellen	49
3.1.2 Expression von RT1B ^I bzw. RT1D ^I in LEW-MHC-Klasse- II-transfizierten L929-Zellen	52
3.1.3 Unterschiede in der Reaktivität von TZH gegenüber RT1B ^I -, RT1D ^I - und HLADR1-präsentierten Superantigenen und Antigenen	53
3.1.3.1 Reaktivität gegenüber Staphylokokken-Enterotoxinen	54
3.1.3.2 Reaktivität gegenüber MAS und YPM	55
3.1.3.3 Reaktivität gegenüber gpMBP und L.casein	56
3.1.4 Veränderungen in der V β -Verteilung einer LEW-T-Zellpopulation unter Präsentation von SEC1, MAS und YPM durch LEW- und humane MHC-Klasse-II-Moleküle	57
3.2 Präsentation von vSag7 durch RT1B^I und RT1D^I	60
3.2.1 Generierung vSag7-positiver Zelllinien	60
3.2.2 Das TZH RG17 erkennt vSag7 nicht im Zusammenhang mit LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen	61
3.2.3 Stimulation von Lymphknotenzellen durch vSag7-positive Zelllinien	62
3.2.3.1 LEW-Lymphozyten werden durch Kokultur mit vSag7- exprimierenden Zellen aktiviert	62
3.2.3.2 Das TZH RG17 wird durch eine Kombination aus H2-A/E exprimierenden Zelllinien und L929-vSag7- Transfektanten aktiviert	64

3.2.3.3 LEW-T-Lymphozyten proliferieren ausgeprägt in Gegenwart vSag7 ⁺ -MHC-Klasse-II ⁻ -Transfektanten bei Kombination mit Maus-oder Ratten-Klasse-II ⁺ -Zelllinien	65
3.2.3.4 Die Injektion vSag7-transfizierter Zellen führt in vivo zu einer Expansion reaktiver Vβ-Gruppen in der LEW-Ratte	67
3.3 Expression gemischter LEW-MHC-Klasse-II-Isotypen	68
3.3.1 P80-Zellen exprimieren nach Transfektion keine gemischten Isotypen auf ihrer Oberfläche	68
3.3.2 Transfektion von P80- und L929-Zellen mit der invarianten Kette der Maus	70
3.3.3 Unter Kotransfektion mit Maus-Ii steigt die Expression regulärer LEW- MHC-II-Moleküle, gemischte Isotypen sind jedoch nicht eindeutig auf der Zelloberfläche nachweisbar	71
3.3.4 Nachweis der RT1B ^l -Kette in isotypisch gemischten und regulären L929-Transfektanten im Western Blot	75
3.3.5 Gemischte Isotypen lassen sich nicht durch intrazelluläre Färbung in transfizierten L929-Zellen nachweisen	76
 4. Diskussion	 79
4.1 Expression von LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen in L929-Zellen	79
4.2 Stimulation von TZh durch Peptidantigene und bakterielle Sag	79
4.3 Stimulation von LEW-Lymphozytenpopulationen durch bakterielle Sag	82
4.4 Reaktivität des TZh RG17 und gemischter T-Zellpopulationen auf LEW- MHC-Klasse-II-präsentiertes vSag7	84
4.5 Expression gemischter LEW-MHC-Klasse-II-Isotypen	88
 5. Zusammenfassung	 93
6. Summary	95
7. Vektorkarten	97
8. Literaturverzeichnis	99
9. Abkürzungen	109

1. Einleitung

1.1 Bestandteile des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen und höherer Organismen ist ein funktionelles Netzwerk aus verschiedenen Zellpopulationen und humoralen Bestandteilen, das in einem streng regulierten Zusammenspiel die Integrität des Individuums gegenüber äußeren und inneren Noxen aufrecht erhält.

Dabei sind Bestandteile zu unterscheiden, die gegen eine Vielzahl variabler Pathogene aktiv werden (unspezifisches Immunsystem) und solche, die aufgrund ihrer Struktur nach Aktivierung nur gegen ein bestimmtes Antigen, dafür aber hochaffin und effizient, vorgehen können (spezifisches Immunsystem). Beide sind in der Ausübung ihrer Funktion eng miteinander verknüpft und aufeinander angewiesen.

1.2 Das unspezifische Immunsystem

Zu dieser Gruppe gehören einerseits Proteine, die die Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen so regulieren, dass diese in ihrer schädigenden Wirkung eingeschränkt werden (z.B. Laktoferrin) oder ubiquitäre Bestandteile eines Pathogens direkt (Komplementsystem, alternativer Lektinweg; Lysozym) bzw. nach Markierung (Komplementsystem, klassischer Weg) angreifen können. Mediatoren, die Abwehrreaktionen des Organismus koordinieren und insbesondere die Zusammenarbeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems vermitteln, sind ebenfalls Bestandteile der unspezifischen Abwehr.

Die zelluläre Komponente beinhaltet phagozytierende Zellen (Granulozyten und Makrophagen), die eine maßgebliche Rolle in der Erregerinaktivierung spielen, und Entzündungsmediatoren freisetzende Mastzellen, die eine schnelle Einleitung der Abwehrreaktion bewirken. Ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt werden natürliche Killerzellen, die vor allem die noch unspezifische Erstantwort auf intrazelluläre Erreger (Viren, bestimmte Bakterien und Parasiten) tragen. Makrophagen und andere sich aus ihren Vorläufern, den Monozyten, entwickelnde Zellen, sind zusätzlich wichtige Aktivatoren der spezifischen Abwehr.

1.3 Zelluläre und humorale spezifische Abwehr

Die Effektorzellen des spezifischen Immunsystems sind Lymphozyten, die sich anhand ihres

Rezeptors in eine B- und T-Zellpopulation unterscheiden lassen. Lymphozyten sind sowohl in ihrer Aktivierung als auch in ihrer Funktionsausübung eng mit der unspezifischen Abwehr verknüpft. Im Gegensatz zu dieser erkennt jede Zelle aber nur eine bestimmte Struktur oder Sequenz, das so genannte Epitop, eines Antigens.

Ursache dafür ist, dass der Rezeptor das Ergebnis eines zufälligen Zusammenbaus bzw. einer Modifizierung der ihn kodierenden Gensegmente ist. Aufgrund der Gesamtzahl an Lymphozyten kann eine unvorstellbar hohe Menge möglicher Antigene erkannt werden. Weiterhin typisch für das spezifische Immunsystem ist die Bildung langlebiger Gedächtniszellen, die bei erneuter Auseinandersetzung mit einem Erreger eine wesentlich schnellere Immunantwort als beim Erstkontakt ermöglichen.

Der Antigenrezeptor von B-Lymphozyten (BZR) besteht aus je zwei leichten und zwei schweren Ketten, die durch VJC- bzw. VDJC-Gensegmente kodiert werden. Die Segmente, die für den variablen Teil des Rezeptors kodieren (VJ bzw. VDJ) liegen genomisch in multiplen Varianten vor (z.B. schwere Kette des Menschen: V 30-65, D 27, J 4-6). Bei der Ausreifung der B-Zellen wird über die V(D)J-Rekombinase aus diesen Varianten eine kodierende V(D)J-Sequenz gebildet, wobei nicht verwendete Elemente dem Zellgenom verloren gehen. An den Verknüpfungsstellen der einzelnen Segmente werden zusätzlich Nukleotide eingefügt (terminale Desoxynukleotidtransferase) oder entfernt (Exonukleasen) und die Sequenz dadurch noch zusätzlich modifiziert. Aufgrund dieser Vorgänge ist das Endprodukt trotz überschaubarem kodierenden Materials hoch variabel.

Die Aktivierung einer B-Zelle kann auf zwei Wege erfolgen. Besitzt ein Antigen eine große Anzahl gleichartiger Epitope, wie es zum Beispiel bei repetitiv aufgebauten Polysacchariden der Fall ist, so kann es zu einer Anlagerung vieler BZR einer reaktiven Zelle kommen und diese durch Kreuzvernetzung direkt aktiviert werden. Andernfalls wird der Antigen-Rezeptor-Komplex aufgenommen, intrazellulär abgebaut und entstehende Peptidfragmente an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden. Diese werden auf der Oberfläche CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert, die bei Erkennung eine Aktivierung der B-Zelle auslösen.

Beide Wege führen zu einer klonalen Expansion der jeweiligen B-Zelle und zur Bildung Antikörper (AK) sezernierender Effektor- und zunächst inaktiver Gedächtniszellen. Zusätzlich erfolgt in der klonalen Expansion nach CD4-abhängiger Aktivierung eine Affinitätsreifung und -selektion des ursprünglichen BZR. Der von B-Lymphozyten als letztendliches Effektormolekül gebildete AK ist eine nicht Membran-gebundene Form des BZR und kann nach Antigenbindung opsonierend auf Phagozyten wirken, das Komplementsystem aktivieren und direkt durch seine Bindung die Funktion bestimmter Pathogenitätsfaktoren (z.B. Toxine) hemmen.

Während B-Lymphozyten native Antigenstrukturen erkennen, ist für die Aktivierung von T-Lymphozyten die Aufbereitung des Antigens zu Peptidfragmenten und deren Präsentation auf speziellen Molekülen notwendig. Der Interaktionspartner ist durch Korezeptoren auf der T-Zelle determiniert, wobei CD4 eine Bindung an MHC-Klasse-II- und CD8 an MHC-Klasse-I-

Moleküle ermöglicht (= MHC-Restriktion; *Zinkernagel et al., 1979*).

T-Lymphozyten sind durch die Anwesenheit eines typisch aufgebauten Rezeptors (TZR) gekennzeichnet, der unter 1.4 näher beschrieben ist. Anhand seines Aufbaus lassen sich zwei Arten von T-Zellpopulationen unterscheiden, von denen die häufigere einen Rezeptor aus einer α - und einer β -Kette besitzt, während der der kleineren Population aus einer γ - und einer δ -Kette besteht. Nachfolgend werden vor allem Charakteristika $\alpha\beta$ -TZR⁺-Zellen beschrieben, da die Funktion der in bestimmten Geweben sogar dominierenden $\gamma\delta$ -Population immer noch relativ unklar ist.

$\alpha\beta$ -TZR-Lymphozyten sind sowohl indirekt an der Abwehr eines Erregers durch Steuerung anderer Immunzellen beteiligt, können aber auch direkt gegen intrazelluläre Erreger vorgehen, indem sie befallene Zellen zerstören. Die erste Funktion wird von CD4⁺-T-Zellen wahrgenommen. Diesen werden durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), MHC-Klasse-II-gebundene Oligopeptide präsentiert, die sie bei reaktivem TZR binden können. Bildet sich eine genügend große Anzahl an TZR-MHC-Peptidkomplexen und erhält die Zelle durch andere interzelluläre Proteinkontakte zusätzliche kostimulatorische Signale, so erfolgt eine Aktivierung mit klonaler Expansion dieser Zelle. CD4⁺-Zellen sind so genannte T-Helferzellen, die nach ihrer Stimulation entweder als Th1-Zellen eine effektive Immunreaktion durch Makrophagen und NK-Zellen ermöglichen oder als Th2-Zellen vor allem an der Aktivierung von B-Zellen (s. dort) beteiligt sind.

CD8⁺-Zellen sind vor allem für die Bekämpfung viraler Infektionen wichtig. Viren nutzen den zellulären Biosyntheseapparat zur Produktion eigener Proteine. Zelleiweiße unterliegen jedoch einem ständigen Abbau im Proteasom, wobei ein Teil der entstehenden Peptidfragmente MHC-Klasse-I-Molekül-gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Werden APZ durch Virenbefall zur Produktion von Fremdproteinen gezwungen, so gelangen auf diesem Weg virale Oligopeptide auf die Zelloberfläche. Reaktive CD8⁺-T-Zellen erkennen den Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex und werden durch zusätzliche kostimulatorische Signale zur Proliferation angeregt. Die aktivierten CD8⁺-Zellen werden als T-Effektor- oder -Killerzellen bezeichnet, da sie nun bei erneuter Bindung eines solchen Komplexes zytotoxische Substanzen freisetzen, die von der infizierten Zelle aufgenommen werden und deren Zelltod herbeiführen.

1.4 Der T-Zellrezeptor

Der TZR ist ein Membran-ständiges, heterodimeres Glykoprotein, das in der Mehrzahl der T-Zellen aus den durch eine Disulfidbrücke verbundenen α - und β -Ketten besteht. Der TZR-Aufbau ähnelt einem Antigen-bindenden Fragment des BZR aus dem VC₁-Teil einer schweren Kette und der mit ihm assoziierten leichten Kette. Analog zum BZR ist die genetische Kodierung des TZR in VJC -Segmenten (bei der β -Kette VDJC) festgelegt, die in unterschiedlich vielen Varianten vorliegen. Das endgültige TZR-Gen entsteht durch Bildung einer funktio-

nalen Sequenz aus den zur Verfügung stehenden Segmenten, deren Variabilität zusätzlich durch das Einfügen von N- bzw. P-Nukleotiden erhöht wird.

Im TZR wird die Aufgabe der Antigenerkennung von den N-terminalen Bereichen der α - und β -Kette wahrgenommen. Diese bilden jeweils vier Schleifen, so genannte CDR (complementarity determining regions), von denen CDR4 (oder HV4 für hypervariable region 4) allerdings nicht an der Peptid-MHC-Komplex-Erkennung teilnimmt. CDR1, 2 und 4 liegen auf der V-Segment kodierten Aminosäuren(AS)-Sequenz, während CDR3 von V-, J- und im Fall der β -Kette auch D-Segmenten kodiert wird. Der Hauptanteil der strukturellen Variabilität des TZR ist durch Unterschiede in CDR3 bedingt, während sich CDR1 und 2 trotz hochvariabler AS-Sequenzen in etwa 90 % der Fälle drei bestimmten Strukturgruppen zuordnen lassen (*Al-Lazikani et al., 2000*). Beide CDR3 des TZR stellen die Bindung zum zentralen Anteil des MHC-gebundenen Peptids her, während CDR1 und 2 sich eher peripher an das Peptid und die umgebende Bindungsgrube anlagern.

Da T-Zellen eine tragende Rolle in der Aktivierung und Steuerung von Immunprozessen spielen, muss die Gefahr einer Aktivierung gegen körpereigene Strukturen minimiert werden. Dazu dienen Selektionsvorgänge bei der Reifung von T-Vorläuferzellen im Thymus, die sowohl CD4⁺-, als auch CD8⁺-Zellen betreffen. Stromazellen des Thymus, die präsentatorische Moleküle exprimieren, testen dabei zunächst auf Interaktionsfähigkeit der T-Zellvorläufer mit MHC-Klasse-I- oder -II-Molekülen. Dazu fähige Zellen überleben (positive Selektion) und werden in einem zweiten Schritt von Makrophagen und dendritischen Zellen (DZ) darauf geprüft, ob sie MHC-gebundene Peptide aus körpereigenen Proteinen erkennen und in diesem Fall eliminiert (negative Selektion). Prinzipiell gelten alle Strukturen bis zu einem variablen Zeitpunkt nach der Geburt als körpereigen, so dass auch Fremdproteine, denen das Individuum in diesem Zeitraum exponiert ist, als "Selbst" erkannt werden (s. 1.9).

Potentiell autoreaktive T-Zellen, die diesen Selektionsmechanismen entgehen, werden normalerweise durch periphere Suppressionsvorgänge inhibiert, so dass keine Autoimmunantwort ausgelöst wird.

Der TZR selbst verfügt nur über kurze intrazelluläre Domänen, die nicht zur Signalübertragung ins Zellinnere fähig sind. Diese Aufgabe wird vom CD3-Komplex wahrgenommen, der zusätzlich eine stabilisierende Wirkung auf den TZR hat und auch an dessen Transport zur Zelloberfläche beteiligt ist. TZR und CD3 bilden zusammen den T-Zellrezeptorkomplex.

1.5 Der MHC

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. MHC für major histocompatibility complex) ist eine Genregion, die für eine Vielzahl an spezifischer und unspezifischer Immunantwort beteiligter Proteine kodiert und in insgesamt 3 Regionen unterteilt ist. Seine Entdeckung geht auf die zu beobachtende Abstoßungsreaktion allo- oder xenogener Transplantate zurück, die

anfangs allerdings noch keine Hinweise auf die tatsächliche Bedeutung der Genprodukte gab. Der menschliche MHC wird als HLA-Komplex bezeichnet und befindet sich auf Chromosom 6. Die Maus- bzw. Ratten-Analoga heißen H2 (Chromosom 17) und RT1 (Chromosom 20). RT1 und H2 zeichnen sich durch eine kolineare Anordnung aus, bei denen Klasse-I-Gene beidseits die Klasse-II-Region flankieren, während im Unterschied dazu sich beim Menschen die Klasse-I-Region nur auf einer Seite der Klasse-II-Region befindet (*Diamond et. al, 1989*).

Wie bereits erwähnt, ist die Antigenerkennung durch den TZR an die Präsentation des Antigens durch spezielle Moleküle gebunden. Diese MHC-kodierten Proteine zeichnen sich durch einen hohen Grad an Polymorphie und Polygenie aus.

MHC-Klasse-I-Moleküle (Mensch HLA-A, B, C, Maus H2-K, D, L, Ratte RT1A, C/M, E) werden mit wenigen Ausnahmen auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie bestehen aus einer transmembranen α -Kette aus 3 Domänen und dem extrazellulär gelegenen, nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, das allerdings weder MHC-kodiert noch polymorph ist.

Die Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen liegt in der Präsentation von Fragmenten zelleigener Proteine gegenüber $CD8^+$ -Zellen. Im Normalfall werden diese Peptid-MHC-Komplexe nicht erkannt, da autoreaktive T-Zellen durch die Thymusselektion eliminiert werden. Produziert eine Zelle jedoch im Rahmen einer viralen Infektion Fremdproteine oder kommt es bei Zellentartung zur Entstehung eines neuen Genprodukts bzw. der Expression eines bisher stummen Gens, so führt die Präsentation von Oligopeptiden aus diesen Proteinen zur Erkennung und Abtötung durch aktivierte $CD8^+$ -T-Lymphozyten.

Wird diese Überwachung durch eine verminderte MHC-Klasse-I-Expression umgangen, so kommen andere Mechanismen zum Tragen, die z.B. NK-Zellen desinhibieren und dadurch zur Abtötung derartiger Zellen veranlassen.

MHC-Klasse-II-Moleküle (Mensch HLA-DP/-DQ/-DR, Maus H2-A, H2-E, Ratte RT1B, RT1D) werden nur von bestimmten Zellarten permanent exprimiert, zu denen B-Lymphozyten und dendritische Zellen als professionelle APZ gehören. Durch bestimmte Einflüsse (z.B. $IFN-\gamma$) kann allerdings fast jede Zellart zur Expression angeregt werden. MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren $CD4^+$ -T-Lymphozyten Oligopeptide aus endozytiertem und intrazellulär gespaltenem Fremdmaterial.

Ähnlich Klasse-I-Molekülen sind Klasse-II-Moleküle hoch polymorph. Besonders stark ist dies bei HLA-DP α , HLA-DQ- und HLA-DR β beim Menschen und allen Einzelketten der Maus bis auf E α (*McNicholas et al., 1982; Mathis et al., 1983*) sowie deren Rattenanaloga ausgeprägt (RT1B ist analog zu H2-A und HLA-DQ, RT1D zu H2-E und HLA-DR).

Klasse-II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine aus zwei transmembranen Einzelketten. Sowohl α - als auch β -Kette bestehen aus zwei Domänen, deren Amino-Termini nach außen weisen und an der Peptidpräsentation teilnehmen, während die C-terminalen Bereiche die transmembranen und cytoplasmatischen Anteile stellen und die für die MHC-Restriktion ausschlaggebenden T-Zell-Korezeptoren binden.

Für die einzelnen Ketten eines MHC-Klasse II-Isotyps existieren zum Teil mehrere Genloci.

Die MHC-Klasse-II-Gene der Ratte zum Beispiel enthalten für RT1B und RT1D jeweils 3 Gene, von denen 2 für eine β -Kette und das andere für die α -Kette kodiert. Von den β - β - α angeordneten Genen werden für RT1B jedoch nur das innere und für RT1D nur das äußere β -Gen translatiert, während das zweite vermutlich funktionslos oder ein stummes Gen ist (*Diamond et al., 1989*). Die Bildung von Dimeren innerhalb einer MHC-Klasse-II-Isotyp-Form liegt unter Kontrolle der β 1-Domäne, da bei der Generierung gemischter Haplotypen unter Verwendung derselben $E\alpha$ - und unterschiedlicher $E\beta$ -Allele verschiedene Expressionsraten erreicht wurden und sich die $E\beta$ -Polymorphie vor allem auf den β 1-Bereich konzentrierte (*Germain et al., 1985*). In anderen Quellen wird ebenfalls eine Rolle der N-terminalen α -Ketten-Domäne diskutiert (*Gilfillan et al., 1990*).

Die Synthese von MHC-Klasse-II-Molekülen erfolgt direkt ins raue endoplasmatische Retikulum (rER), wo sich beide Einzelketten sofort zu einem Dimer vereinigen. Da im rER große Mengen körpereigener Peptide vorhanden sind, ist es essentiell, dass diese nicht gebunden werden, um das Entstehen einer Immunreaktion gegen den eigenen Organismus zu verhindern. Kurz nach der Dimerbildung assoziiert das neu synthetisierte Molekül daher mit der so genannten invarianten Kette (Ii). Dieses Molekül liegt im rER als Homotrimer vor, wobei jeweils eine Untereinheit ein MHC-Klasse-II-Molekül derart bindet, dass dessen Bindungsfurche blockiert wird. Im Weiteren wird Ii sequenziell proteolytisch gespalten, so dass nur noch ein kleiner Rest, das sogenannte CLIP-Fragment (class-II-associated invariant chain peptide), in der MHC-Klasse-II-Bindungsgrube verbleibt. Der endgültige Austausch des CLIP-Fragments mit dem zu präsentierenden Peptid erfolgt in speziellen Vesikeln, die das MIIC (MHC class II compartment) bilden (*Grigg et al., 1998*).

Trotz der Ii-Bedeutung für die Funktion von Klasse-II-Molekülen ist eine Expression auch in Abwesenheit nachzuweisen (*Miller et al., 1986*). Dennoch kann Ii die Menge von an der Zelloberfläche präsentierten MHC-Klasse-II-Molekülen steigern, besonders in Fällen, in denen die Dimerbildung durch das Vorliegen ungünstiger Kettenallele (haplotypisch gemischte MHC-Klasse-II-Moleküle) erschwert ist (*Layet et al., 1991*).

Der eigentliche Austausch wird von einem MHC-Klasse-II-ähnlichen Molekül katalysiert, das beim Menschen als HLA-DM (Maus H-2M, Ratte RT1M) bezeichnet wird. Dieses ermöglicht die Dissoziation des CLIP-Fragments und stabilisiert durch eigene Bindung noch nicht beladene MHC-Klasse-II-Moleküle, die ansonsten abgebaut werden würden. Zusätzlich verhindert es die Anlagerung von Peptiden, die nur geringe Affinität zum Klasse-II-Molekül haben und dadurch an der Zelloberfläche potentiell durch körpereigene Peptide ersetzt werden könnten. Die Funktion von HLA-DM wird durch HLA-DO, ein weiteres MHC-kodiertes Protein, reguliert. Die Polymorphie im MHC ist allgemein auf die präsentatorischen Moleküle beschränkt, während Proteine wie Ii, HLA-DM oder -DO, die Transport oder Peptidbeladung steuern, stark konserviert sind und oft eine hohe Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Spezies aufweisen.

Die nicht polymorphe Klasse-III-Region kodiert für Bestandteile des Komplementsystems (C2 und C4), Angehörige der TNF-Familie sowie andere Immunsystemkomponenten.

1.6 Interaktion zwischen TZR und Peptid-MHC-Molekül-Komplex

Sowohl im Aufbau als auch in der Bindung des TZR an das präsentierte Peptid bestehen Unterschiede zwischen MHC-Klasse-I- und -II-Molekül-Präsentation. In Studien an Kristallen, bestehend aus den 3 Komponenten des Komplexes konnten Erkenntnisse über die räumliche Orientierung und die Interaktion der beteiligten Untereinheiten gewonnen werden.

In einem MHC-Klasse-I-Peptid-TZR-Komplex zeigt sich eine diagonale Orientierung des TZR auf der Peptid-Klasse-I-Molekül-Oberfläche (*Sun et al., 1995*). $V\alpha$ CDR1 und 2 kommen über dem Amino-Ende des Peptides zu liegen, während CDR1 und 2 der β -Kette in der Nähe des Carboxy-Endes binden. Alle vier interagieren jedoch nicht nur mit dem Peptid sondern auch mit der Bindungsgrube benachbarten MHC-Strukturen. Von beiden CDR3, die die höchste Variabilität innerhalb der CDRs aufweisen, bindet CDR3 α zentral an das Peptid, während CDR3 β zum C-terminalen Ende hin verschoben ist. CDR4/HV4 ist vermutlich nicht an der Erkennung präsentierter Peptide beteiligt, interagiert aber mit verschiedenen Superantigenen (*Sag, s. 1.8*).

In der Präsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle ist der TZR hingegen orthogonal ausgerichtet. $V\alpha$ bindet an die helikale Region der β 1- und $V\beta$ an die helikale Region der α 1-MHC-Klasse-II-Domäne (*Reinherz et al., 1999*). Da die Peptidbindungsgrube im Unterschied zu MHC-Klasse-I-Molekülen nach beiden Enden hin offen ist, ist auch die Größe der präsentierten Peptide variabler.

1.7 Superantigene

Superantigene sind Proteine bakteriellen oder viralen Ursprungs und führen auf einem von der normalen Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle gänzlich unterschiedlichen Weg zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten.

Ein herausragendes Merkmal aller Sag ist, dass sie ohne proteolytische Aufbereitung, die ihre Aktivität zerstören würde, an der Zelloberfläche exprimierte MHC-Klasse-II-Moleküle binden. Die $CD4^+$ -Restriktion der MHC-Klasse-II-Molekülbindung ist zumindest in vitro aufgehoben, d.h. auch $CD8^+$ -T-Zellen werden aktiviert, allerdings bestehen Hinweise auf eine Dominanz der $CD4^+$ -Aktivierung in vivo (*Sundberg et al., 2002*) und eine dadurch bestimmte pathogene Wirkung.

Sag aktivieren T-Zellen nicht abhängig von der Spezifität des TZR, sondern basierend auf seiner Zugehörigkeit zu einer bestimmten $V\beta$ -Familie. Da z.B. beim Menschen die Anzahl der $V\beta$ -Gene auf etwa 60 beschränkt ist (*Torres et al., 2001*) und Sag in unterschiedlichem Maße promiskuitiv sind, können 5-30 % aller T-Zellen aktiviert werden. Im Umkehrschluss ist die Wirksamkeit eines Sag allerdings gleichzeitig an die Anwesenheit reaktiver T-Zellen gebunden.

Zudem ist die V β -Spezifität Spezies-übergreifend, beispielsweise werden in Maus, Mensch und Ratte durch MAS, YPM und verschiedene Staphylokokken Enterotoxine (SE) zueinander homologe V β -T-Zellpopulationen aktiviert (*Herman et al., 1991; Sellins et al., 1992; Herrmann et al., 1994; Kreiss et al., 2004*).

Andere Bestandteile des T-Zellrezeptors sind für die spezifische Sag-Anlagerung von keiner oder nur geringer Bedeutung, wirken aber stabilisierend auf den gebildeten Komplex.

Nach Exposition mit einem Sag reagieren T-Zellen zunächst durch Proliferation und einer damit verbundenen Zytokinausschüttung. Naive T-Zellen werden nachfolgend entweder delettiert oder anerg, während bereits vorher stimulierte T-Zellen u.U. weiter aktiv bleiben können (*Torres et al., 2001*).

1.8 Bakterielle Superantigene und Interaktion mit TZR und MHC-Klasse-II-Molekül

Bakterielle Sag finden sich als Produkte von Staphylokokken und Streptokokken (so genannte pyrogene Sag), Yersinien und Mykoplasmen. Trotz starker Unterschiede in der AS-Sequenz findet sich bei allen pyrogenen Sag eine ähnliche Struktur. Es sind Proteine mit zwei unterschiedlich großen globulären Domänen aus β -Faltblättern, die über eine zentrale α -Helix miteinander verbunden sind (*Sundberg et al., 2002; Zhao et al., 2004*).

Ihr Carboxy-Ende weist Homologien zu den Immunglobulin(Ig)-Bindungsmotiven der Streptokokken-Proteine G und L auf, während das Amino-Ende der Oligonukleotid-/Oligosaccharid-Bindungsstelle von AB₅-Toxinen (z.B. *V. cholerae*, *B. pertussis*) ähnelt. Einzelne Sag sind hoch polymorph, wobei sich die einzelnen Genprodukte vor allem in ihrer Antigenität, jedoch nicht in ihrer Spezifität und Mitogenität unterscheiden. Pyrogene Sag besitzen drei potentielle Bindungsstellen für MHC-Klasse-II-Moleküle, von denen zwei sich überlappende am Amino-Terminus und eine weitere am C-Terminus liegen.

Die beste Charakterisierung der MHC-Klasse-II-Interaktion mit Sag findet sich für HLA-DR. Dieses Molekül verfügt über eine hochaffine Bindungsstelle an der β -Kette, an die eine Zink-abhängige Sag-Anlagerung erfolgen kann und eine gering affine an der α -Helix der α 1-Domäne (*Sundberg et al., 2002*). Sag wie SEA benutzen beide Bindungsmotive, während andere wie SEB und SEC1-3 (*Bernal et al., 1999; Hoffmann et al., 1994*) nur an die gering affine oder wie SEH nur an die hochaffine binden. Ebenfalls konnten Auswirkungen der HLA-DR-Polymorphie auf die Präsentation verschiedener SE gefunden werden (*Herman et al., 1990*).

Speziell durch Kristallanalysen konnten in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über die Interaktion von Sag mit TZR und MHC-Klasse-II-Molekül gewonnen werden. In Studien mit SpeC (Streptokokken-Pyrogenes-Exotoxin C, *Li et al., 2001*) und SEH (*Petersson et al., 2001*) konnte gezeigt werden, dass diese Sag mit ihrem Carboxy-Ende an die α -Helix der β 1-Domäne von HLA-DR binden und dabei auch mit dem N-terminalen Teil des potentiell gebundenen Peptids interagieren können. In letzter Zeit ist zunehmend die Abhängigkeit der Sag-Funktion

an ein solches am Klasse-II-Molekül gebundenes Peptid untersucht worden, wobei gezeigt werden konnte, dass das Vorliegen eines bestimmten Peptids die Sag-Potenz stark erhöhen kann (*Wen et al., 1997*).

Möglicherweise imitieren Sag auf diese Art die Dichte von TZR-Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexen einer regulären T-Zellaktivierung, um dadurch eine eventuelle Überstimulation mit direkter Anergie oder Apoptose zu vermeiden (*Sundberg et al., 2002*). Ebenfalls könnte das gebundene Peptid auch als Indikator für die Art und damit die Stimulationspotenz einer APZ dienen (*Woodland et al., 1997*).

Da allerdings bisher mit Ausnahme des nicht pyrogenen MAS (s. dort) die Synthese eines Kristalls aus allen vier beteiligten Komponenten nicht gelungen ist, basieren Erkenntnisse über deren räumliche Anordnung vorläufig noch auf einer grafischen Überlagerung von Heterodimeren bzw. -trimeren.

Die Bindung des TZR durch pyrogene Sag erfolgt über den Spalt zwischen beiden Sag-Domänen, dessen Struktur für die V β -Spezifität verantwortlich ist.

Für SEB und SEC3 ist bei Bindung V β 8.2⁺-T-Zellen die Interaktion mit CDR2, framework region (FR) 2 und in geringerem Umfang mit CDR4/HV4 und FR3 des V β -Bereichs bekannt, die zusätzlich durch Kontakte von CDR1 und 2 der TZR- α -Kette mit dem Klasse-II-Molekül stabilisiert wird (*Sundberg et al., 2002*). Hierbei handelt es sich um eine so genannte konformationelle Bindung, bei der nur Hauptkettenatome des V β -Abschnitts ohne zusätzliche Beteiligung der Seitenketten involviert sind.

Die Interaktion von SpeA mit Maus-V β 8.2⁺-TZR geschieht trotz hoher struktureller Homologie zu SEB zusätzlich auch über CDR1 und beinhaltet Kontakte zu Seitenketten der Aminosäuren (AS), wodurch die Bindung zwar weniger variabel aber auch affiner wird (*Malchiodi et al., 1995*). SpeC mit der größten TZR-Kontaktfläche unter pyrogenen Sag bindet die CDR1-4 sowie FR2 und FR3 (*Li et al., 1997*).

In einer anderen Studie (*Kreiss et al., 2004*) konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität V β 8.2⁺-T-Zellen in LEW-Ratten gegenüber den Sag MAS, YPM, SEB und SEC1 durch gezielte Mutationen beeinflusst werden kann. Bei Veränderungen in CDR2 β oder CDR4 β erlosch die Antwort auf SEC1 und SEB, während sich bei YPM und MAS praktisch keine Veränderung nachweisen ließ.

Eine noch ungeklärte Frage ist die Funktion von aus einzelnen Sag gebildeten Di- oder Trimeren. Die Fähigkeit zur Dimerbildung ist für verschiedene Sag, vor allem unter Beteiligung von Zink-Ionen beschrieben (*Al-Daccak et al., 1998; Langlois et al., 2003*). Eine mögliche Funktion könnte in der Kreuzvernetzung von MHC-Klasse-II- und TZR-Molekülen auf den beteiligten Zellen liegen, die eine Aktivierung von T-Lymphozyten oder APZ begünstigen würde (*Sundström et al., 1996; Roussel et al., 1997*).

Trotz ihrer strukturellen Homologie verbinden pyrogene Sag TZR und MHC-Klasse-II-Moleküle auf durchaus unterschiedliche Weise. SEB z.B. wirkt als Keil zwischen TZR und Klasse-II-Molekül, so dass es zu einer TZR-Rotation um dessen Kontaktpunkt mit dem Sag an

CDR2 β kommt und das MHC-gebundene Peptid von allen CDRs bis auf CDR2 α entfernt wird. Ähnlich ist der Mechanismus bei TSST-1 (toxic shock syndrome toxin 1), auch wenn der TZR in diesem Fall zusätzlich in Richtung der MHC-Klasse-II- β -Kette verschoben wird und dadurch beide CDR3 über dieser zu liegen kommen. SpeC hingegen fungiert als Brücke zwischen TZR und MHC-Klasse-II-Molekül und hebt den Kontakt zwischen diesen komplett auf (*Sundberg et al., 2002*).

In der Stärke der Bindung eines Sag an seine Zielmoleküle ist somit auch immer der Restbeitrag an Stabilität zu berücksichtigen, den verbleibende Klasse-II-TZR-Kontakte beitragen. Sag wie SpeC müssen daher aufgrund deren kompletten Fehlens eine wesentlich höhere Bindungsstärke aufweisen als z.B. SEB.

Der Bindungsmodus der ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Sag MAS und YPM unterscheidet sich, ebenso wie ihre räumliche Struktur, dagegen erheblich von dem pyrogenen Sag. Das durch *Cole (1991)* erstbeschriebene MAS zeichnet sich durch eine fehlende Homologie zu allen anderen bekannten Sag (*Cole et al., 1996*) und eine starke Präferenz in der MHC-Klasse-II-Bindung für HLA-DR und Analoga der Maus (*Etongue-Mayer et al., 2002*) aus.

In einer Kristallstrukturanalyse (*Zhao et al., 2004*) konnte gezeigt werden, dass MAS vor allem mit N-terminalen Anteilen an die α 1- (mit Kontakt zum präsentierten Peptid) und in geringerem Umfang an die β 1-Domäne des MHC-Klasse-II-Moleküls bindet, während die Bindung des TZR über eine Vertiefung zwischen beiden MAS-Domänen erfolgt (*Wang et al., 2007*).

Die Struktur des im Gegensatz zu pyrogenen Sag komplett α -helikal aufgebauten Moleküls ist L-förmig und durch einen hohen Anteil an Wasserstoffbrücken stabilisiert. In der erstgenannten Studie konnte auch die Bildung asymmetrischer Dimere aus MAS-Molekülen und deren potentielle Fähigkeit zur Kreuzvernetzung von Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche gezeigt werden, wobei beide Monomere für den Kontakt zum Klasse-II-Molekül die gleiche Interaktionsstelle benutzen.

2007 wurde von *Wang et. al* die Kristallstruktur eines aus MAS, HLA-DR1 mit gebundenem Hämagglutinin und dem Maus-Einzelketten-TZR T7 bestehenden Komplexes präsentiert. Hier zeigte sich, dass MAS ähnlich SpeC die Verbindung zwischen TZR und HLA-DR1 komplett aufhebt und entsprechend eine Brücke zwischen diesen bildet. Erstaunlich ist der große Anteil der TZR-V α -Domäne in der Bindung von MAS, der mehr als 50 % der TZR-V β -Kontaktfläche beträgt und insbesondere CDR2 und 3, aber auch CDR1, FR2 und FR3 beinhaltet. Bereits *Hodtsev et al. (1998)* konnten Hinweise dahingehend finden, dass die Erkennung von MAS durch den TZR mit der selektiven Benutzung bestimmter V α -Regionen einhergeht, so dass im Unterschied zu den meisten pyrogenen Sag für MAS eine V α - und V β -spezifische TZR-Bindung zu bestehen scheint. Der Kontakt der V β -Domäne mit MAS wird vor allem durch CDR1 und CDR2, aber auch durch CDR3, FR1, FR3 und HV4 hergestellt und entspricht bis auf die CDR3-Einbeziehung fast vollständig der Bindungsstelle von SEB und SEC3. Im Unterschied zu diesen Sag, bei denen eine konformationelle TZR-Bindung vorliegt (*Sundberg*

et al., 2002), bindet MAS neben Haupt- auch im größeren Umfang Nebenkettentome des TZR (Sequenzabhängigkeit). Unabhängig davon konnten strukturelle Unterschiede in CDR1, CDR2 und FR3 der V β -Domäne für Unterschiede in der MAS-Reaktivität verantwortlich gemacht werden (*Li et al.*, 2005).

Das von *Yersinia pseudotuberculosis* produzierte YPM (*Erstbeschreibung durch Miyoshi-Akiyama et al.*, 1993) unterscheidet sich ebenfalls deutlich von anderen Sag. Die bekannten Varianten (a,b und c) zeigen keine Sequenz-Homologie zu anderen Proteinen, allerdings ähnelt die Struktur einigen viralen Kapsidproteinen und Mitgliedern der TNF-Familie (*Holm et al.*, 1993). Andere Yersinien-Spezies wie *Y. pestis* oder *enterocolica* besitzen keine YPM-Gene. YPM besitzt im Vergleich zu pyrogenen Sag ein wesentlich geringeres Molekulargewicht (14 kd gegenüber 22-29 kd) und besteht aus zwei β -Faltblättern mit je 4 antiparallelen Strängen (*Donadini et al.*, 2004). In einem Kristall ordnet sich YPM ähnlich den o. g. strukturverwandten Proteinen als Trimer an, konnte aber bisher in Lösung nur als Monomer nachgewiesen werden, so dass eine eventuelle Bedeutung der Aggregation für die Sag-Funktion unklar ist. Allerdings könnte diese auch unter den besonderen Bedingungen in der Kontaktregion zweier Zellen erfolgen und eine Kreuzvernetzung von MHC-Klasse-II-Molekülen und TZR bewirken. Wenig bekannt ist immer noch über die Interaktionsstellen von YPM zu TZR und MHC-Klasse-II-Molekül. In der bisher größten gerichteten Mutationsstudie (*Ito et al.*, 1999) konnten bei über das ganze Molekül verteilten Veränderungen starke Unterschiede in der Mitogenität festgestellt werden, allerdings zeigte sich, dass dies vor allem auf Differenzen in der Tertiärstruktur des Moleküls und damit seiner sterischen Funktionsfähigkeit zurück zu führen war.

In einer anderen Studie zeigten Mutationen in CDR2 oder 4 der V β -TZR-Kette reaktiver LEW-V β *8.2-T-Zellen keine Auswirkungen auf die Reaktivität gegenüber YPM und lassen daher auf andere Interaktionsorte schließen (*Kreiss et al.*, 2004).

1.9 Virale Superantigene

Proteine mit Sag-Aktivität sind ebenfalls in verschiedenen Virusspezies, darunter Retro-, Herpes- und Rabiesviren, nachgewiesen worden (*Sutkowski et al.*, 2001).

Das bekannteste und in seiner Funktion am besten charakterisierte Sag ist jedoch das durch das mammary tumor virus (mtv) 7, ein integriertes Provirus der Maus, kodierte vSag7. Lange Zeit wurde es als minor lymphocyte stimulating locus-1^a bezeichnet, da MHC-Klasse-II-identische, aber mtv7⁻-Lymphozyten eine Proliferation auf mtv7⁺-APZ zeigten (*Festenstein*, 1973) und man es daher für ein funktionell MHC-Klasse-II-ähnliches Molekül hielt.

In der Nomenklatur werden Mamma-Tumroviren der Maus, die durch Integration in die Keimbahn genomisch verankert sind, mit mtv abgekürzt. Nur wenige dieser Proviren haben die

Fähigkeit zur Virionenproduktion erhalten. Infektiöse mtv-Stämme werden hingegen mit MMTV (mouse mammary tumor virus) unter Angabe des Stammes der Erstisolierung bezeichnet. Praktisch alle bekannten mtv und alle MMTV kodieren für ein Sag (*Acha-Orba et al., 1995*).

Der Übertragungsweg des MMTV zeigt die Bedeutung eines Sag für die Persistenz und die Pathogenität eines Virus. MMTV wird normalerweise beim Säugen über die Milch vom Muttertier auf die Jungen übertragen. Im Darm werden die Virionen in den Peyer'schen Plaques aufgenommen und infizieren primär B-Lymphozyten, die das Genom des Retrovirus integrieren und das Sag MHC-Klasse-II-Molekül-gebunden CD4⁺-T-Zellen präsentieren. Deren reaktive Proliferation und die damit verbundene Zytokinproduktion regen die B-Zellen zur Teilung an, wodurch gleichzeitig eine massive Vermehrung des Virusgenoms erfolgt. Infizierte Lymphozyten fungieren auch als Transportvehikel des Virus zu und innerhalb seiner Zielorgane, insbesondere des Brustdrüsenparenchyms. Komplexe Steuerungsmechanismen (v. a. Sexualhormone) regulieren die Produktion infektiöser Partikel und auch mtv-kodierter Sag und verursachen eine massive Steigerung in Pubertät, Schwangerschaft und Stillzeit.

Die Kanzerogenität der MMTV beruht auf dem Einbau in das Genom der Zielzelle und eine damit verbundene zufällige Aktivierung zellulärer Onkogene. Auch wenn eine direkte Rolle des Sag an der Krebsentstehung ausgeschlossen werden kann, korreliert die Tumorsuszeptibilität mit der Güte der Sag-MHC-Klasse-II-Präsentation.

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Infektion in B-Zell-defizienten Mäusen nicht möglich ist und in athymischen, also T-Zell-defizienten Tieren, nicht persistieren kann. Auch Sag-Deletionsvarianten von MMTV führen nur zu einer latenten Infektion (*Golovkina et al., 1998*).

Perinatal übertragene Viren bewirken nach initialer Expansion reaktiver T-Zellen deren Deletion in der Peripherie oder im Thymus, gleiches gilt für Proviren, die während der Ontogenese Sag exprimieren. Die T-Zelldeletion in der Peripherie bewirkt einerseits eine erhöhte Resistenz gegenüber MMTV mit derselben T-Zellspezifität, scheint aber andererseits, möglicherweise durch Toleranzinduktion gegenüber viralen Proteinen, die Empfänglichkeit für eine MMTV-Infektion zu erhöhen, sofern diese Viren andere V β -TZ-Gruppen aktivieren (*Golovkina et al., 1992*).

Die Auswirkungen einer MMTV-Infektion bzw. einer mtv-Expression betreffen jedoch neben der adaptiven auch die unspezifische Abwehr. Über das SU-Protein bindet MMTV neben anderen Oberflächenproteinen an Toll-like Rezeptor (TLR) 2 und 4 auf APZ und aktiviert damit die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (*Rassa et al., 2002*). *Bhadra et al. (2006)* zeigten, dass ein mtv-negativer Mausstamm sowohl gegen MMTV-Infektion und deren Folgen als auch gegen andere Erreger resistenter ist als vergleichbare mtv⁺-Individuen. Bei MMTV-C3H-Übertragung zeigte sich eine erniedrigte Viruslast, die jedoch nur in 30% der Fälle mit der Anwesenheit neutralisierender AK einherging, zudem war bei Injektion von mtv-exprimierenden Fibroblasten unmittelbar nach Entwöhnung mtv⁻-Tiere keine periphere TZ-Deletion zu

detektieren. Auch gegenüber der Lymphominduktion des nicht Sag-produzierenden TBLV (Type B leukemogenic virus)-Stammes (MMTV-Variante) waren diese Tiere resistent.

Bei Übertragung von *V. cholerae* zeigte sich in *mtv*⁻- im Vergleich zu *mtv*⁺-Tieren bereits nach 24 Stunden eine reduzierte Erregerlast, zu einem Zeitpunkt also, in der eine effektive adaptive Immunantwort noch gar nicht besteht. Beides deutet darauf hin, dass auch die Resistenz gegenüber Sag-produzierenden MMTV-Stämmen ebenfalls durch die Abwehr des unspezifischen Immunsystems zumindest mitbedingt ist. Im Gegenzug scheint die Anwesenheit des *mtv*-Sag eine verminderte Aktivität des unspezifischen Immunsystems zu bewirken, so dass der *mtv*-Status vor allem bei Tiermodellen infektiöser Erkrankungen eine Rolle spielen kann.

Das in dieser Arbeit verwendetet *vSag7* ist das Sag von *mtv7* und im open reading frame (orf, U3 Region) des long terminal repeats (LTR) kodiert. Trotz des detaillierten Wissens über die Bedeutung der Sag im MMTV-Lebenszyklus ist über die eigentliche Struktur des Sag und seine Interaktion mit TZR und MHC-Klasse-II-Molekül relativ wenig bekannt.

In der Lewis/Crl (LEW)-Ratte stimuliert *vSag7* $V\beta 6^{+}$ -, $V\beta 8.2^{+}$ - und in geringerem Umfang $V\beta 8.5^{+}$ -T-Zellen, unabhängig von CDR3 und der TZR- α -Kette (*Herrmann et al., 1994; Gold et al., 1994*). Der Vergleich verschiedener $V\beta 8.2$ -Familienmitglieder zeigte, dass Unterschiede in CDR2 und 4 einen Verlust der *vSag7*-Reaktivität bewirken können.

Die AS-Sequenz des *vSag7* weist auf ein Transmembranprotein hin, dessen C-Terminus extrazellulär liegt. Allgemein ist die Sequenz innerhalb verschiedener *mtv* hochkonserviert und zeigt nur C-terminal ausgeprägte Polymorphismen, die mit einer veränderten $V\beta$ -Reaktivität assoziiert und damit vermutlich an der Interaktion mit dem TZR beteiligt sind.

Weiterhin ist davon auszugehen, dass die eigentliche Sag-Aktivität von einem Fragment des primären orf-Genprodukts getragen und dieses zusätzlich durch Glykosylierungsprozesse modifiziert wird, wobei für ein 18 kD großes C-terminales Spaltprodukt bereits eine Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle nachgewiesen wurde. Im Rahmen der proteolytischen Reifung des Sag ist weiterhin eine nicht-kovalente Assoziierung N- und C-terminaler Spaltprodukte wahrscheinlich. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass reifes *vSag7* zunächst unabhängig vom Klasse-II-Molekül an die Oberfläche gelangt und erst dort an dieses assoziiert und dadurch stabilisiert wird (*Grigg et al., 1998*).

In der MHC-Klasse-II-Interaktion ergibt sich eine Einteilung in zwei Gruppen. Die eine, zu der auch *vSag7* gehört, kann sowohl von H-2E- als auch H-2A-Molekülen präsentiert werden, während andere *vSag* auf H-2E angewiesen sind. Allgemein wurde bisher davon ausgegangen, dass H-2E für alle *vSag*, wenn nicht das einzige, so doch das beste Präsentationsmolekül ist. Allerdings bestehen Hinweise darauf, dass die eigentliche Bindungsstärke ohne Betrachtung der T-Zellstimulation bei bestimmten *mtv*-Sag für H-2A höher ist (*Acha-Orbea et al., 1995*).

In einem Vergleich der Präsentation durch verschiedene HLA-DR-Allele konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in der β -Kette bei unveränderter α -Kette die Sag-Bindung stark verändern können und damit eine Interaktionsstelle im Bereich der β -Kette liegen muss (*Subramanyam et al., 1993*).

Ein Beispiel für Sag produzierende endogene Retroviren findet sich auch im menschlichen Genom. Die HERV-(humanes endogenes Retrovirus)K-Familie enthält 10 Proviren, deren Sag bis auf HERV-K18, bei dem eine starke INF- α -Abhängigkeit besteht, konstitutiv und in geringen Mengen exprimiert werden (*Stauffer et al., 2001*).

Wie im nächsten Kapitel ausgeführt, ist die Einordnung dieser Proteine in die Gruppe der Sag bzw. ihre Rolle in bestimmten Krankheiten allerdings teilweise noch sehr umstritten.

1.10 Superantigene und Krankheit

Um eine Verbindung zwischen einem bestimmten Krankheitsbild und einem Sag herzustellen, war lange Zeit der Nachweis einer V β -spezifischen T-Zellproliferation in situ unter Anwesenheit eines mutmaßlich als Sag fungierenden Proteins ausschlaggebend. Unter zunehmender Verwendung rekombinanter Techniken zeigte sich jedoch, dass einige dieser “Sag-Kandidaten” in vitro keine stimulative Kapazität aufwiesen.

Ein immer noch umstrittenes Beispiel sind die Exfoliatine A und B, die lange Zeit als Sag und Verursacher der Epidermisablösung 1-2 Wochen nach einem durch Staphylokokkeninfektion verursachten toxischen Schocksyndrom galten. Inzwischen wird die Ursache in einer Serinproteasenaktivität dieser Proteine gesehen, die zu einer Spaltung epidermaler Adhäsionsproteine führt und auf diesem Weg die Dermisintergrität aufhebt (*Vath et al., 1997; Vath et al., 1999*).

Auch variieren allgemein Ausmaß und zeitlicher Verlauf einer Sag-bedingten T-Zellreaktion mit der Dosis und dem Aufnahmeweg (*Bernal et al., 1999*).

Die Pathogenität von Sag lässt sich in die direkte Wirkung im Rahmen einer Infektion und potentielle Folgeerscheinungen unterscheiden, wobei zusätzlich wichtig ist, dass Erreger oft ein Gemisch verschiedener Sag gleichzeitig produzieren, dessen Wirkung außerdem von der Anwesenheit neutralisierender AK abhängig ist.

In einer akuten Infektion liegt die das Pathogen begünstigende Wirkung in der Verhinderung oder zumindest Verzögerung einer spezifischen Immunantwort durch eine massive, Th1-dominierte Zytokinfreisetzung aus CD4⁺-T-Zellen (v. a. INF- γ , IL-2, TNF α). Dies führt bei pyrogenen Sag zu einer systemischen Entzündungsreaktion, die ohne Bakteriämie Symptome einer Sepsis zeigt (systemic inflammatory response syndrome = SIRS) und auch für die lebensbedrohlichen Komplikationen verantwortlich ist.

Die generalisierte Mediatorenfreisetzung erhöht die Kapillarpermeabilität und verursacht dadurch einen Flüssigkeitsverlust in das umgebende Gewebe, der eine Schocksymptomatik mit generalisiertem Ödem, im weiteren verbunden mit der Gefahr einer Verbrauchskoagulopathie und eines Multiorganversagens, nach sich ziehen kann (*Dinges et al., 2000*).

Andere Symptome, wie die durch SE hervorgerufene Emesis und andere gastrointestinale

Krankheitszeichen könnten auch auf eine direkte oder indirekte Aktivierung von Mastzellen mit verstärkter Leukotrienfreisetzung zurückzuführen sein (*Scheuber et al., 1987*). Im weiteren Verlauf verursachen die T-Zell-produzierten Zytokine auch eine Induktion anderer Mediatoren-produzierender Enzyme, wie z.B. der Cyclooxygenase 2 und der induzierbaren NO-Synthetase (*Bernal et al., 1999*).

Von den beiden anderen untersuchten bakteriellen Sag ist YPM mit dem Großteil extragastrointestinaler Symptome (z.B. Erythema nodosum, Konjunktivitis) einer Infektion mit *Yersinia pseudotuberculosis* assoziiert, während MAS als Virulenzfaktor eines Tierpathogens an der Entstehung einer rheumatoiden Arthritis bei Nagetieren beteiligt ist.

In einer Untersuchung direkter Therapieansätze bei Sag-bedingten Symptomen konnte *Kämpfer (2004)* zeigen, dass sich die Wirkung pyrogener Sag durch Peptide, die zu konservierten Sag-Sequenzen homolog sind, spezifisch antagonisieren lässt. Dadurch konnte in Tierversuchen eine wesentliche Erhöhung der Überlebensrate Sag-exponierter Tiere erreicht werden. Ein weiterer interessanter Aspekt dieser Studie war, dass den antagonisierten konservierten Sequenzen bisher keine Rolle in der Sag-Funktion zugeschrieben wurde.

Eine potentielle Entstehung autoimmuner Krankheiten als Folge einer Sag-Exposition ist ebenfalls in vielen Studien untersucht worden. Die Annahme basiert auf der Beobachtung, dass naive T-Zellen bei Sag-Exposition nach anfänglicher Proliferation zwar deletiert oder anerg werden, dies allerdings nicht bei Sag-Stimulation bereits aktivierter T-Zellen erfolgt. Auf diesem Weg könnten Sag autoreaktive T-Zellen, die bisher unter Suppression des Immunsystems standen, aktivieren und somit zum Krankheitsausbruch beitragen (*Torres et al., 2001*).

In der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell für bestimmte Aspekte der Multiplen Sklerose (MS), das durch Applikation ZNS-spezifischer Proteine, wie z.B. des Myelin-Basischen-Proteins (MBP), ausgelöst werden kann, wurde ebenfalls die Auswirkung einer Sag-Gabe auf Entstehung und Verlauf gezeigt. In Tieren, die normalerweise gegen die Induktion von EAE resistent sind oder solchen, die sich bereits wieder von einem Schub erholt hatten, konnte ein EAE-Ausbruch oder -Rezidiv ausgelöst werden. Ebenfalls konnte bei EAE durch Sag-Gabe eine auch bei MS häufig auftretende intramolekulare Epitopausbreitung hervorgerufen werden (*Soos et al., 2002*).

Darüber hinaus gibt es viele andere Krankheitsbilder, die mit einem fehlgeleiteten Immunsystem einhergehen und bei denen Hinweise für eine Beteiligung von Sag an der Pathogenese bestehen.

Vor einiger Zeit wurde ein von Darmbakterien produziertes potentielles Sag I2 entdeckt, das möglicherweise mit M. Crohn assoziiert ist (*Dalwadi et al., 2001*), dessen Rolle für die Erkrankung allerdings immer noch nicht genau bekannt ist. Andere Beispiele sind das Kawasaki-Syndrom, die Colitis ulcerosa und rheumatoide Arthritis, aber auch Hauterkrankungen wie Psoriasis und die atopische Dermatitis (*Donadini et al., 2004*).

Sutkowski et al. (2001) zeigten die Interaktion einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion mit dem HERV-K18-kodierten Sag. EBV führt zu einer vermehrten Expression dieses Sag auf

mRNA-Ebene und nachfolgend zu einer Stimulation $V\beta 13^+$ -T-Zellen, die zudem durch Anti-MHC-Klasse-II- und -Sag-Ak inhibierbar war. Die Theorie, dass diese Sag-Funktion für eine EBV-Persistenz erforderlich ist, wird dadurch gestützt, dass Primaten-Stämme ohne HERV-K18 nur latente EBV-Infektionen entwickeln (*Thorley-Lawson, unveröffentlichte Daten, Verweis in Sutkowski et al., 2001*).

Eine Beteiligung von HERV-K18-Sag wurde auch im Zusammenhang mit Typ-1-Diabetes vermutet (daher Bezeichnung des Sag als IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus)-K_{1,2}22). *Stauffer et al. (2001)* zeigten, dass die bei viralen Infektionen im Rahmen der Immunantwort auftretenden erhöhten $INF-\alpha$ -Werte zu einer verstärkten Sag-Expression führten und dadurch eine Proliferation von $V\beta 7^+$ -T-Zellen auslösen, die sich auch vermehrt in entzündlichen Infiltraten im Pankreas bei Typ 1 Diabetes zeigen. Allerdings konnte dies, insbesondere der Nachweis einer Sag-Aktivität von IDDM-K_{1,2}22, in anderen Arbeitsgruppen bisher nicht bestätigt werden (*Lapatschek et al., 2000*).

Ein in gewisser Weise vergleichbarer Mechanismus ist jedoch für das mouse acquired immunodeficiency syndrome (MAIDS) beschrieben. In der durch ein defektes Virus verursachten Erkrankung wurde lange Zeit aufgrund einer gleichzeitig beobachteten Expansion $V\beta 5^+$ -T-Zellen die Existenz eines viral-kodierten Sag angenommen, jedoch konnte eine derartige Aktivität der Virusproteine ausgeschlossen werden. *Gayama et al. (1998)* zeigten schließlich, dass die Virusinfektion zu einer verstärkten Expression endogener Retroviren der mtv-Familie, speziell der orf-kodierten Sag führte, die ebenfalls die beobachtete T-Zellreaktion erklärte und daher insgesamt als Beispiel für die Interaktion exogener Erreger mit endogenen Retroviren dienen kann.

Die bei Sag-Applikation beobachtete Verstärkung der Aktivität bereits stimulierter T-Zellen bietet allerdings möglicherweise auch einen Ansatz für eine therapeutische Verwendung. Studien an Melanom-erkrankten Mäusen zeigten, dass die Gabe eines Sag zu einer verstärkten Immunantwort gegen die entarteten Zellen und zu einer Verbesserung der Überlebenszeit führen kann (*Torres et al., 2001*). Inwieweit sich dies jedoch auf andere Karzinomkrankungen übertragen lässt und ob ein solcher Einsatz beim Menschen tatsächlich erfolgen kann, ist allerdings noch nicht abzusehen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Einmalspritzen	Nenke-Sass-Wolf
Gewebekulturflaschen	Nunc
Kryoröhrchen	Eppendorf Gerätebau
Mikrotiterplatten (96-Napf) Flachboden	Greiner Labortechnik
Mikrotiterplatten (96-Napf) Rundboden	Greiner Labortechnik
Multischale (6/12/24/48 Näpfe)	Greiner Labortechnik
Petrischalen (Ø 6cm/9cm)	Nunc
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Roth
Pipettenspitzen (crystal)	Eppendorf Gerätebau
Plastikpipetten	Greiner Labortechnik
Plastikreaktionsgefäße	Eppendorf Gerätebau
Sterilfilter	Millipore
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik

2.1.2 Reagenzkits

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed
QIAgen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
QIAgen Plasmid Midi-Kit	Qiagen
2 * PCR-Kit	MBI Fermentas
OptEIA-IL-2-ELISA-Kit	Pharmingen
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen
Jet Sorb Gel Extraction Kit	Genomed

2.1.3 Enzyme und Inhibitoren

	<i>Hersteller</i>
Iodoacetamid	Sigma Chemie
Leupeptin	Sigma Chemie
Pefabloc	Sigma Chemie
Protease Inhibitors Set	Roche Diagnostics
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Biolabs
Shrimp acid phosphatase	USB
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

2.1.4 Antikörper

Monoklonale Antikörper (Hersteller: Pharmingen BD)

<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>
Ox6	β -Kette RT1B, H2-A
14-4-4S	α -Kette RT1D, H2-E
41A	RT1D, H2-E
R73	Ratte: C β -TZR
V65	Ratte: $\gamma\delta$ -TZR
Ox35	Ratte: CD4
L180/1	Schaf: LFA-1
R78	Ratte: V β 8.2-TZR (LEW)
B73	Ratte: V β 8.5-TZR (LEW)
HIS 42	Ratte: V β 16-TZR (LEW)
SN18B1	Ratte: V β 13-TZR (LEW)

Sonstige Antikörper

		<i>Hersteller</i>
DaMIg-PE	Phycoerythrin-konjugiertes Esel-anti-Maus-Ig	Dakopatts
SaMIg	Schaf-anti-Maus-Ig	Dakopatts
nMIg	normales Maus-Ig	Sigma Chemie

2.1.5 Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamid (Mono-/Bis-)	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Gibco/BRL
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Gibco/BRL
β -Mercaptoethanol	Gibco/BRL
Borsäure	Roth
Calciumchlorid	Roth
Concanavalin A	ICN
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Ethanol	Ferak
Ethidiumbromid	Sigma Chemie
Fötale Kälberserum	Gibco/BRL
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Ferak
Glycin	Roth
Geneticin (G418)	Sigma Chemie
IL-2 (rekombinant, human)	Hoechst
Ionomycin	Sigma Chemie
Isopropanol	Roth
Luria Broth Base	Invitrogen
Mitomycin C	Sigma Chemie
Natriumazid	E. Merck
Natriumacetat	Roth
Natriumbutyrat	E. Merck
Nylonwolle	Fenwal Laboratories
Penicillin	Gibco/BRL
PMA	Sigma Chemie
Polybrene	Sigma Chemie
Ponceau S	Applichem
SDS	Roth
Streptavidin-Red670	Gibco/BRL
Streptomycin	Gibco/BRL
Tetramethylendiamin (TEMED)	E. Merck

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Tris	Roth
Triton X	Sigma Chemie
Trypanblau	Sigma Chemie
Tween 20	Sigma Chemie

2.1.6 Nährmedien

Zellkultur (Hersteller: Gibco BRL, Eggenstein, BRD)

	<i>Kodierung</i>
<i>RPMI 1640</i>	# 21875-034
<i>RPMI 1640 Dutch Modification</i>	# 22409-015

- Verwendung nach Zugabe von 50 ml SC-Supplement (bezeichnet als RPMI⁺)

<i>DMEM mit Pyruvat, ohne HEPES</i>	# 41966-029
<i>DMEM ohne Pyruvat, mit HEPES</i>	# 32430-027

- Verwendung nach Zugabe von 50 ml FCS und 800 µl Streptomycin-Penicillin-Lösung (bezeichnet als DMEM⁺)

<i>Einfriermedium:</i>	50% FCS
	40% RPMI ⁺
	10% DMSO

Bakterienkultur

<i>LB-Medium</i>	20 g Luria Broth Base in 1 l Aqua dest.
	• nach Lösen autoklavieren

- Verwendung nach Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml)

LB-Agar

25 g Luria Broth Base

15 g Agar-Agar

in 1 l Aqua dest.

- vollständiges Lösen durch Autoklavieren

- Verwendung als Nährmedium in Nicht-Gewebekultur-Petrischalen (Ø 9cm):
Zunächst Abkühlen auf 50°C, Hinzugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) und Einfüllen von 20 ml pro Schale, Lagerung bei 4°C

2.1.7 Puffer und Lösungen**Institutseigene Herstellung***- 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 β-Mercaptoethanol

- PBS

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄0,05 g MgCl₂

8 g NaCl

1,15 g Na₂HPO₄

- in 1 l Aqua dest.

- ATV-Lösung

0,05 % Trypsin

0,02 % EDTA

- in PBS

- FACS-Puffer

0,2 % BSA

0,02 % Natriumazid

- in PBS

- BSS • gleiche Volumenanteile BSS I und BSS II

<u>BSS I:</u>	50 g Glukose	<u>BSS II:</u>	9,25 g CaCl ₂
	3 g KH ₂ PO ₄		20 g KCl
	11,9 g NaH ₂ PO ₄		320 g NaCl
	0,4 g Phenolrot		10 g MgSO ₄
	• jeweils in 5 l Aqua dest		

- BSS/BSA 0,2 % BSA in BSS

Eigene Herstellung

- 2xHBS 50 mM HEPES (pH 7,05)
10 mM KCl
12 mM Glucose
280 mM NaCl
1,5 mM NaH₂PO₄

- ELISA-Coating-Puffer 8,4 g NaHCO₃
3,56 g Na₂HCO₃
• in 1 l Aqua dest.

- Waschpuffer (ELISA und Westernblot) 0,05 % Tween 20 in PBS

- ELISA-Blockierungspuffer 10 % FCS in PBS

- TBE-Puffer (5x) 495 mM Tris
495 mM Borsäure
10 mM EDTA
• in Aqua dest.

- TE-Puffer 1 mM Tris
0,1 M EDTA
• in Aqua dest.

- SaMIg-Lösung 40 µg/ml in PBS

- Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml in Aqua dest.

- *Trypanblaulösung* 0,04 % Trypanblau in FACS-Puffer

- *Westernblot-Puffer*

Anode I-Puffer

1 M Tris (pH 10,4)
10 % Methanol

Anode II-Puffer

25 mM Tris (pH 10,4)
10 % Methanol

Kathoden-Puffer

25 mM Tris (pH 10,4)
10 % Methanol
40 mM Glycin

- *Western-Blot-Blockierungspuffer*

75 g Milchpulver in 1 l PBS/0,1% BSA

- *Zelllysispuffer (RIPA)*

20 mM Tris
150 mM NaCl
1 mM EDTA
2,5 mM Natriumpyrophosphat
1% Triton X
1 mM β -Glycerolphosphat

2.1.8 Versuchstiere

Verwendet wurden LEW/Crl-Ratten und BALB/c-Mäuse im Alter zwischen 6-12 Wochen aus institutseigener Züchtung.

2.1.9 Zelllinien

- L929-Zellen MHC-Klasse-II⁻-Fibroblastenzelllinie der Maus
- P80-Zellen MHC-Klasse-II⁻-, Ratten-CD80-transduzierte P815 Maus-Mastozytomlinie der DBA/2 Linie (*Maeda et al., 1997*)
- 53.4 Ratten-TZR-V β 8.2⁺-TZH, generiert durch Fusion der MBP-spezifischen Zelllinie MBP13 und BW58, TZR identisch mit TZH 35/1 (*Kreiss et al., 2004*)

- RG17 TZR-V β 6⁺-Maus-TZH (*Dr. Glasebrook, Lilly Research Laboratories, Indianapolis, USA*)
- P3/2 + CD80 mit HLA-DR1 (*Herman et al., 1990*) und Ratten-CD80 (*AG Herrmann*) transfizierte DAP3-Mausfibroblasten
- 3A5 mit HLA-DR1 und vSag7 transfizierte DAP3-Mausfibroblasten (*Subramanyam et al., 1993*)
- Klon 19 TZH, generiert durch Fusion einer L.casein-spezifischen Zelllinie und BW 58 (*AG Herrmann*)
- LBB 3.4.16 mtv7⁺-Hybridom aus der B-Zelllymphomlinie M12.4.15 (H-2^d) und RF/J-Milzzellen (H-2^k, mtv-7⁺) (*Nicolas et. al, 1987*)
- LBB IIV11 mtv-7-Deletionsvariante von LBB 3.4.16 (*Nicolas et. al, 1987*)
- 293T ursprünglich als 293tsA1609neo bezeichnete Verpackungszelllinie für retrovirale Transfektion (ATCC#CRL11268), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Lindemann, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg

2.1.10 Bakterienstämme

- Top 10 F' One ShotTM Top 10F' kompetente Bakterien (Invitrogen)
- DH5 α Novagen

2.1.11 Primer

- *mtv-7-orf forward* 5'-GGGAATTCATGCCGCGCCTGCAG-3'
- *mtv-7-orf reverse* 5'-GGGTCGACAGATCTCCGCAAGTAGACCTG-3'

2.1.12 Bakterielle Superantigene

- MAS freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. Rink, Medizinische Universitätsklinik, RWTH Aachen
- SEB, SEC 1-3 Toxin Technology, Saragota, Florida, USA
- YPM freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Miyoshi Akiyama, Institut für Mikrobiologie und Immunologie, Tokyo Womens Medical School, Japan

2.1.13 Antigene

- MBP Biotrend
- L.casein freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gerhild Wildner, Augenklinik der Universität München

2.1.14 Vektoren (Plasmide)

- SFG-GFP (S65T) enthält das für das grün-fluoreszierende Protein (gfp) kodierende Insert (*Bueler et al., 1996*)

Nach Entfernung des Inserts zusätzlich verwendet als Träger für:

- RT1B^l α / RT1B^l β : beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Matthias Kreiß, AG Herrmann (*Kreiss et al., 2004*)
- RT1D^l α / RT1D^l β : beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Hatice Karaüzüm, AG Herrmann (*Karaüzüm, 2003*)
- pczCFG-IEGZ-3mli: Zeomycin-Resistenz- und gfp-kodierender Vektor, Vektor ohne Insert freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I. Berberich, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Insert kodiert für die invariante Kette der Maus (Klonierung: Henry Dlaske, AG Herrmann)
- pH β A-Pr-1-neo: Neomycin-Resistenz tragender Vektor, Insert unter Kontrolle des humanen β -Aktin-Promotors (*Gunning et al., 1987*)

- pH β A-Pr-1-orf: pH β A-Pr-1-neo, der die vSag7-kodierende orf-Sequenz enthält (*Beutner et al., 1992*), wie leerer Vektor freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Natalie Sutkowski, Department of Pathology, Tufts University School of Medicine, USA
- pHIT 60 pHIT-60-CMV-MVV-gag-pol-SV40 ori, enthält Gene für *gag* und *pol* des Moloney-Murinen-Leukämie-Virus (MoMLV) unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus (CMV)-Promotors (*Soneoka et al., 1995*)
- pczVSV-G wt, enthält das *env*-Gen des Vesicular Stomatitis Virus (VSV, *Yee et al., 1994*)
- pcEx-3mli enthält als Insert das Gen für die invariante Kette der Maus, freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. Norbert Koch, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie, Universität Bonn

2.1.15 Marker

DNA-Marker (MBI-Fermentas)

vor Verwendung jeweils mit Gelladepuffer versetzte DNA-Fragmentkombinationen

- *100 bp-Marker* (10 Fragmente von 100 bis 1000 bp in 100er Schritten)
- *1 kbp-Marker* (14 Fragmente: 250 - 10000 bp)

Proteinmarker (MBI Fermentas)

- *180 kD-Marker* (Banden zwischen 10 und 180 kD)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Restriktionsspaltung

Der Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurde zur Charakterisierung und Identifizierung benutzter Vektoren, aber auch im Rahmen von Klonierungen zur Vorbereitung der jeweiligen Komponenten und zur Überprüfung der Insertorientierung nach erfolgter Ligation verwendet.

Ein Ansatz enthielt im Normalfall folgende Bestandteile

- 0,3 µg DNA in TE-Puffer
- 2 µl 10x Puffer (für Enzym ausgewählt nach Herstellerangaben)
- 0,5 -1 µl Restriktionsenzym (5-10 U Gesamtaktivität)

Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und für 60 min unter für die Aktivität des jeweiligen Enzyms optimaler Temperatur inkubiert.

Die Überprüfung eines Restriktionsverdaus erfolgte durch Gelelektrophorese.

2.2.2 DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Spaltprodukten erfolgte je nach erwarteter Größe der einzelnen Fragmente in 1 %- oder 2 %-igen Agarosegelen.

Die abgewogene Menge Agarose wurde in 0,5 %-igem TBE-Puffer aufgeköcht, nach Abkühlen im Wasserbad auf < 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml) und in einer Gelkammer ausgegossen.

Aufzutrennenden Ansätzen wurde ein Zehntel ihres Volumens an Ladefarbstoff hinzugefügt und diese anschließend in die Geltaschen verbracht. Zusätzlich wurde ein Marker (1 kbp oder 100 bp) mit zur Analyse geeigneten DNA-Fragmentlängen aufgetragen.

Nach einer 45-60-minütigen Auftrennung bei 115 V wurde das Gel unter UV-Licht, das das zwischen die Doppelstränge der DNA interkalierende Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, fotografiert.

2.2.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Nach einer elektrophoretischen DNA-Auftrennung wurde unter UV-Licht zunächst das die gewünschte DNA enthaltende Gelstück ausgeschnitten und gewogen.

Die eigentliche Elution geschah mit Hilfe des Jet Sorb Gel Extraction Kits.

Nach Anweisung des Herstellers wurde das Gelstück zunächst in Puffer geschmolzen und die enthaltene DNA an zugegebene Silikatpartikel gebunden. Nach mehrfachem Waschen wurde die DNA durch Resuspension in TE-Puffer wieder gelöst. Mittels Zentrifugation konnten die Silikatpartikel abgetrennt und der die DNA enthaltende Überstand isoliert werden.

2.2.4 Transformation

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut und ein Volumen von $100\ \mu\text{l}$ in Eppendorf-Röhrchen mit $5\ \text{ng}$ des zu übertragenden Plasmids vermengt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz $45\ \text{s}$ in einem Wasserbad (42°C) erwärmt und anschließend für $2\ \text{min}$ erneut auf Eis gelagert.

Danach wurde der Ansatz in $15\ \text{ml}$ -Röhrchen verbracht und nach Zugabe von $900\ \mu\text{l}$ SOC-Medium $60\ \text{min}$ in einem Bakterienrüttler geschwenkt (37°C , $180\ \text{RPM}$).

Volumina von 50 bzw. $100\ \mu\text{l}$ aus diesem Ansatz wurden auf vorgewärmten, Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank gelagert, jedoch nicht länger als $15\ \text{h}$. Anschließend wurde der Transformationserfolg mittels Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung ermittelt.

2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.5.1 Anlage einer Vorkultur

In $5\ \text{ml}$ Ampicillin-haltiges LB-Medium wurden mittels Impföse Bakterien einer einzelnen Kolonie nach erfolgreicher Transformation oder aus einem bei -70°C gelagerten Glycerinstock der gewünschten Plasmid-Bakterienkultur verbracht und $8\ \text{h}$ im Bakterienrüttler bei 37°C und $180\ \text{RPM}$ geschwenkt.

Aus dieser Vorkultur konnte Suspensionsvolumen sowohl direkt zur Plasmidbestimmung im analytischen Maßstab als auch zur Großpräparation nach weiterer Vermehrung in frischem Nährmedium entnommen werden.

Zur Erstellung eines Glycerinstocks wurden $150\ \mu\text{l}$ einer Vorkultur mit $850\ \mu\text{l}$ Glycerin (4°C) vermischt und in Kryoröhrchen bei -70°C gelagert.

2.2.5.2 Großpräparation von Plasmid-DNA

Die Isolation großer Plasmidmengen geschah mit Hilfe des QIAgen Maxi bzw. Midi Kits. Hierzu wurde zunächst Volumen einer Vorkultur 1/500 bis 1/1000 in Ampicillin-haltigem LB-Medium verdünnt (bis zu 50 ml in Midi Kit bzw. 500 ml in Maxi Kit) und über Nacht (12-16 h) im Bakterienrüttler geschwenkt (37°C, 180 RPM).

Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurden die Bakterien am nächsten Tag lysiert und auf eine Säule geladen, an deren Filtermatrix die Plasmid-DNA zunächst band und aus der sie in einem weiteren Schritt eluiert werden konnte.

Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und in TE-Puffer gelöst.

2.2.5.3 Analytische Präparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse einer größeren Anzahl von Ansätzen, z.B. zur Überprüfung einer Klonierung wurde das JetQuick Plasmid Miniprep Spin Kit verwendet.

Hierfür wurden zunächst 1,5 ml Bakteriensuspension aus einer Vorkultur in Eppendorf-Caps bei 14000 RPM und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 250 µl Zelllösung (L1) resuspendiert und mit 250 µl Lysispuffer (L2) aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 250 µl Neutralisationspuffer (L3) hinzugegeben und der Ansatz 10 min bei RT und 14000 RPM zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Cap verbracht und mit 70 % des Ansatzvolumens an 2-Propanol (hier 525 µl) aufgefüllt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 RPM und 4°C wurde der Überstand verworfen und 500 µl 70%-iges Ethanol hinzugegeben wurden.

Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min) unter denselben Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Pellet nach kompletter Ethanolabdunstung in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde durch Extinktionsmessung im Photometer bestimmt.

2.2.6 Klonierungen

2.2.6.1 Vorbereiten des Vektors

Von den benutzten Vektoren pczCFG5-IEGZ und pczCFG5-IZ lag nur der erste direkt verwendungsfähig in linearisierter und dephosphorylierter Form vor.

Der Vektor pczCFG5-IZ enthielt als Insert die DNA-Sequenz des Ratten CD80-Moleküls. Durch Restriktionsverdau von 5 µg Vektor mit Eco RI wurde das Insert ausgeschnitten und der linearisierte Vektor nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und eluiert.

Um während der Ligation eine End-zu-End-Verknüpfung ohne Einbau des Inserts zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Dephosphorylierung durchgeführt.

Der Ansatz aus

- 32 µl Vektoreluat (mit max. 5 µg DNA)
- 4 µl 10x Puffer
- 4 µl shrimp acid phosphatase (1 U/µl)

wurde 15 min bei 37° C inkubiert und anschließend die Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt.

2.2.6.2 Vorbereiten des Inserts

Das für Maus-Ii kodierende Insert wurde durch Restriktionsverdau mit EcoRI aus dem Vektor pcEx-3mIi ausgeschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert.

2.2.6.3 Ligation

Zur Abschätzung der einzusetzenden Vektor- und Insertvolumina wurden Aliquots in einem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Aus der Intensität der Banden wurden die für ein gewünschtes 1/4-Verhältnis von Vektor zu Insert benötigten Mengen abgeleitet.

Der Ansatz, bestehend aus:

0,6 - 1 µl	Vektor
2 µl	Insert
1 µl	10x-Puffer
1 µl	T4-Ligase
5,4 - 5 µl	destilliertes Wasser

wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert

2.2.7 RNA-Extraktion aus Zellkulturen

Die Gewinnung von RNA wurde mit Hilfe des QIAgen RNeasy Kits durchgeführt. Maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers zunächst behandelt und auf eine Säule aufgetragen, an deren Filtermatrix die RNA band und durch nachfolgende

Elution von anderen Zellysatebestandteilen isoliert werden konnte.

Der RNA-Gehalt eines Ansatzes wurde mittels Extinktionsmessung im Photometer bestimmt.

2.2.8 PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) dient zur Vermehrung geringer Mengen vorhandener DNA. Dabei werden 2 Oligonukleotide (Primer) benutzt, die zu den 3'-Enden des zu amplifizierenden Abschnitts komplementär sind.

Durch Erhitzen werden zunächst die beiden DNA-Stränge getrennt (Denaturierung) und eine Anlagerung der Primer ermöglicht (Hybridisierung).

Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird ausgehend vom Primer ein zum Ausgangsstrang komplementärer Strang gebildet (Elongation), der in einem nächsten Zyklus als Ausgangsstrang für eine erneute Primeranlagerung zur Verfügung steht.

Dies bewirkt eine exponentielle Vermehrung der gewünschten Sequenz, so dass im Anschluss auch weniger sensitive Verfahren zur Analyse eingesetzt werden können.

Um die für die Einzelschritte eines Zyklus erforderlichen Temperaturen optimal einzustellen, wurde die PCR in speziellen dünnwandigen 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßen durchgeführt.

Zusammensetzung eines typischen Ansatzes:

- 12,5 µl 2 x PCR Master-Mix, enthält

Taq-DNA-Polymerase	0,05 U/µl
MgCl ₂	4 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	jeweils 0,4 mM

in Reaktionspuffer

- 0,1-1 µM forward primer
- 0,1-1 µM reverse primer
- 10 pg - 1 µg DNA

jeweils in destilliertem Wasser

Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 25 µl aufgefüllt und die Reaktion mit Hilfe eines Perkin-Elmer-Thermocyclers durchgeführt.

Insgesamt wurden 30 Zyklen, bestehend aus

Denaturierung:	60 s bei 94°C
Hybridisierung:	60 s bei 64°C
Verlängerung:	60 s bei 72°C

durchlaufen. Die letzte Verlängerungsphase (final elongation) betrug 10 min, um noch nicht vollständig auspolymerisierte Stränge zu komplettieren.

Während Denaturierungs- und Verlängerungstemperatur Primer-unabhängig sind, wird die Hybridisierungstemperatur 5°C niedriger gewählt als der Mittelwert der Schmelztemperaturen beider Primer. Generell kann man bis zu einer gewissen Basenzahl die Schmelztemperatur T_m eines Primers aus den in ihm vorhandenen Basenanteilen mit folgender Formel näherungsweise berechnen.

$$T_m = (4 * (\text{Guanin} + \text{Cytosin}) + 2 * (\text{Adenin} + \text{Thymin}))^\circ\text{C}$$

Das Vorhandensein eines PCR-Produkts wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft.

2.2.9 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase(RT)-PCR dient zur Gewinnung von cDNA aus RNA. Im Gegensatz zur Standard-PCR findet nur ein Oligothymidin als Primer Verwendung, das zum Polyadenosinende reifer mRNA komplementär ist.

Durch eine reverse Transkriptase wird ausgehend vom Primer ein zur mRNA-komplementärer cDNA-Strang gebildet.

Die RT-PCR erfasst Sequenz-unabhängig jedes poly-Adenosin-tragende RNA-Molekül und vermehrt die Nukleinsäuremenge nur linear, da in der Polymerisierung keine zur Primeranlagerung geeigneten Stränge synthetisiert werden.

Zusammensetzung eines Ansatzes:

- 0,1-0,5 µg Gesamt-RNA in Nuklease-freiem, destilliertem Wasser (DEPC-Wasser)
- 1 µl Oligothymidinprimer (0,5 µg/µl)

Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 11 μl aufgefüllt und 5 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und folgende Komponenten hinzugegeben:

- 4 μl 5x Reaktionspuffer
- 1 μl RNase-Inhibitor (20 U/ μl)
- 2 μl dNTP-Mix (10 mM)

Der Ansatz wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von

- 2 μl Maus-MuLV reverse Transkriptase (20 U/ μl)

Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion im Anschluß durch 10-minütiges Inkubieren bei 70°C gestoppt. Die synthetisierte cDNA konnte danach direkt, z.B. in einer PCR, weiterverwendet werden.

2.2.10 Sequenzierung

Um nach Übertragung eines Inserts in einen neuen Vektor die korrekte Integration zu prüfen wurde eine Sequenzierung unter Einbeziehung der Einfügungsstellen durchgeführt.

In der auf der Methode nach Sanger basierenden Sequenzierung wird nur ein zu einer im Vektor vorhandenen Basenabfolge komplementärer Primer verwendet.

Die Komponenten entsprechen ansonsten denen einer normalen PCR, bis auf die Tatsache, dass neben normalen dNTPs Farbstoff-markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) hinzugegeben werden, wobei jeder Farbstoff auf eine bestimmte Basenart beschränkt ist.

Da den ddNTPs die Verknüpfungsstelle für eine weitere Verlängerung der Nukleinsäure fehlt, erfolgt bei ihrem Einbau der Syntheseabbruch, so dass über den Verlauf der Reaktion ein Gemisch aller möglichen Fragmentlängen entsteht.

Die Sequenz wurde nach Reaktionsende und Fällung des Fragmentgemisches mittels des ABI 310 Sequencers ermittelt, wobei Position und Typ einer Base in der Ausgangssequenz aus der Fragmentlänge und dem endständigen Farbstoff bestimmt wurde.

Bestandteile des Ansatzes:

- 1 μl BD
- 1 μl Primer
- 1 μl 2,5x Puffer
- 2 μl DNA

Insgesamt wurden 30 Zyklen im Sequenzier-PCR-Gerät durchlaufen, die aus jeweils 3 Phasen bestanden (10 s 96°C, 5 s 50°C, 4 min 60°C).

2.2.11 Transduktion von Genen in eukaryontische Zellen

2.2.11.1 Kalziumphosphatpräzipitation

Diese Methode basiert auf der Bildung von Präzipitaten aus DNA und CaPO_4 , die von Zellen aufgenommen werden und sowohl zu einer transienten als auch permanenten Expression des Zielgens führen können.

Obwohl zeitlicher und materieller Aufwand gering sind, liegen die Schwächen dieser Methode im geringen Anteil erfolgreich transfizierter Zellen und dem Problem der transienten Transfektion verbunden mit dem progredienten Verlust des übertragenen Gens, so dass häufig eine Selektion durch Genkopplung mit einer Resistenz oder Fluoreszenz erfolgen muss.

Die Kalziumphosphatpräzipitation wurde in der Übertragung des vSag7-Gens in native und bereits RT1B^L- bzw. RT1D^L-transfizierte L929-Zellen angewendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden je $5 \cdot 10^5$ Zellen in TC-Petrischalen (\varnothing 6 cm) ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert (Kulturmedium DMEM⁺). Je 15 μg der zu übertragenden DNA wurden mittels Ethanol präzipitiert und sterilisiert, in 100 μl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen und bis zur Transfektion bei 4°C (max. 2 Tage) oder -20°C gelagert.

Vor der Transfektion wurde das Medium der Zielzellen durch DMEM ohne HEPES ersetzt, da HEPES den für die Präzipitatbildung kritischen pH beeinflusst, und die Zellen 1 h im Brutschrank inkubiert. Die DNA Ansätze wurden mit 338 μl Aqua dest. und 62 μl 2M CaCl_2 -Lösung auf 500 μl Endvolumen aufgefüllt und gut durchmischt. Jeweils 500 μl 2x HBS wurden hinzugegeben und mit Hilfe einer Pipette unter Schaumbildung vermennt, bevor der Ansatz möglichst gleichmäßig über die Zellkultur getropft und durch leichtes Schwenken verteilt wurde. Es folgte eine 6-8-stündige Inkubation im Brutschrank, nach der die Zellen zunächst jeweils einmal mit PBS + 3x EDTA und PBS ohne Zusatz gewaschen wurden, um verbliebene Präzipitate vollständig zu entfernen, wonach das Medium durch HEPES-haltiges DMEM⁺ ersetzt wurde.

Eine Selektion der Zellen begann aufgrund der Zellmembranschädigung durch die gebildeten Präzipitate frühestens 2 Tage nach der Transfektion.

Als Anhaltspunkt für die Effizienz einer Transfektion diente ein Ansatz mit gfp, der in einem Mikroskop unter UV-Licht auf das Vorhandensein grün-fluoreszierender Zellen überprüft wurde. Der Nachweis der vSag7-Übertragung geschah funktionell und durch direkten Gennachweis in einer RT-PCR/PCR.

2.2.11.2 Retroviraler Gentransfer

Diese Methode der Genübertragung basiert zunächst auf der Transfektion einer Verpackungszelllinie (hier 293T-Fibroblasten) durch Kalziumphosphatpräzipitation und einer darauf aufbauenden Gentransduktion in die Zielzelllinie durch ein in den 293T-Zellen gebildetes Retrovirus.

In der Kalziumphosphatpräzipitation werden die für die Bildung des Retrovirus notwendigen Komponenten und das zu untersuchende Gen übertragen.

Verwendet wurden hier das im pHIT-60 enthaltene *gag*- und *pol*-Gen des MoMLV und das im pVSV-G enthaltene VSV-*env*-Gen. Das *env*-kodierte G-Glykoprotein ermöglicht die Transfektion einer Vielzahl von Zelllinien über Interaktion mit Phospholipidkomponenten der Zellmembran.

Die übertragenen Gene werden in der Verpackungszelllinie transkribiert und translatiert und Viruspartikel aus den synthetisierten Proteinen gebildet.

Der das interessierende Gen tragende Vektor enthält ein Verpackungssignal, das den Transport zugehöriger mRNA in die Virionen ermöglicht. Gleichzeitig bleibt das entstehende Virus vermehrungsunfähig, da den für die Virusproteine kodierenden Sequenzen bzw. ihren Plasmiden dieses Signal fehlt und diese daher nicht eingebaut werden.

In der Regel besteht das Virus also aus MoMLV- bzw. VSV-Hüll- und Kapsidkomponenten und enthält als Genom das interessierende Gen als mRNA.

Durch Inkubation der Zielzelllinie mit dem virushaltigen Überstand wird die mRNA übertragen und anschließend durch die im Virus enthaltene reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die über die enthaltenen LTR-Sequenzen ins Zielzellgenom eingebaut und von der transfizierten Zelle abgelesen wird.

Tag 1

$0,8 - 1,6 \cdot 10^6$ 293T-Zellen wurden in 6-cm-TC-Petrischalen ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Je 5 µg der Plasmide pHIT 60, pVSV und dem das zu untersuchende Gen tragenden Plasmid wurden in einem Ansatz mittels Ethanol präzipitiert, sterilisiert und in 100 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen.

Tag 2

Die Weiterbehandlung der Plasmidansätze und deren Übertragung erfolgten entsprechend 2.2.11.1. Nach der Inkubation wurde das Medium direkt durch HEPES-haltiges DMEM⁺ ersetzt und über Nacht im Brutschrank gelagert.

Tag 3

Das Medium wurde durch DMEM⁺ mit 10 mM Natriumbutyrat ersetzt, da dieses, möglicherweise als Histondeacetylierungsinhibitor, die Transkription der eingebrachten Plasmide erhöht und damit die Virusproduktion steigert. Nach 8-12 h Inkubation wurde das Medium abgenommen, Natriumbutyrat-Reste durch einmaliges Waschen mit Medium entfernt und die Zellen in DMEM⁺ über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Tag 4

Der virushaltige Überstand wurde abgenommen, durch 0,45 µm Filter steril filtriert und Polybrene zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml hinzugegeben.

Polybrene ist ein Polykation, das die Einschleusung des Virusgenoms durch Interaktion mit negativ geladenen Strukturen der Virus- und Zelloberfläche erleichtert.

1*10⁵ adhärenente Zielzellen wurden an Tag 3 in 12-well-Kulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. An Tag 4 wurde das Medium abgenommen und durch jeweils 1-1,5 ml des benötigten Virusüberstandes ersetzt.

Suspensionszellen hingegen wurden direkt an Tag 4 geerntet und in einer Konzentration von 1*10⁵ Zellen auf jeweils 1-1,5 ml Virusüberstand in 12-well-Platten getropft.

In beiden Fällen wurden die Ansätze zunächst für 60 min im Brutschrank inkubiert und anschließend 100 min bei 37°C und 2000 RPM zentrifugiert.

Nach erneuter 60-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und durch normales Medium ersetzt.

Zusätzlich wurde auch hier ein gfp-Ansatz verwendet, der zur Kontrolle der Transfektion der Verpackungs- und der Transduktion der Zielzelllinie diente.

Die Zielzellen wurden frühestens nach 2 Tagen, entweder AK-vermittelt oder durch Detektion einer mitübertragenen Fluoreszenz (gfp), auf Expression des übertragenen Gens getestet.

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteingemische können in einem elektrischen Feld aufgetrennt und dadurch einzelne Fraktionen sichtbar gemacht bzw. durch weitere Bearbeitung (hier Western Blot) sogar ein einzelnes Protein identifiziert werden.

Bei der SDS-PAGE wird Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate) hinzugegeben, das in einem konstanten Verhältnis an Proteine bindet. Dadurch wird deren Eigenladung maskiert und ein ähnliches Ladungs-Masse-Verhältnis erreicht.

Da auch die Tertiärstruktur der Proteine durch den SDS-Einfluss angeglichen wird, erfolgt die

Auftrennung dementsprechend nur auf Basis des Molekulargewichts.

Zur Herstellung des zu untersuchenden Proteingemisches wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen pelletiert, in 200 μl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren sorgfältig resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 30 min bei 13000 RPM und 4°C zentrifugiert und der Überstand in Aliquots von 100 μl aufgeteilt und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Auftrennung wurden 100 μl des Lysats mit 20 μl 6x Loading Dye versetzt (enthält 5% Mercaptoethanol), 4 min bei 102°C im Heizblock erhitzt und anschließend sofort wieder auf Eis gelagert. Die Separierung erfolgte etwa 150 min bei 35 mA in 12%-igen Polyacrylamid-Gelen, denen 3%-ige Sammelgele überschichtet waren.

<i>Gelzusammensetzung</i>	3%-ig (6 ml)	12%-ig (10 ml)
• Acrylamid (Mono-/Bis-)	0,78 ml	4 ml
• Tris	0,75 ml (1 M, pH 6,8)	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)
• SDS (10 %)	60 μl	100 μl
• Aqua dest.	3,76 ml	3,35 ml
• TEMED/APS (10%)	14 μl /40 μl	10 μl / 50 μl

2.2.13 Western Blot

Nach Beendigung einer SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine in einem zweiten Schritt auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies fand in einer speziellen Blotkammer unter Verwendung der unter 2.1.7 aufgelisteten Anoden- und Kathodenpuffer statt.

Im Anschluss wurde der Proteintransfer durch Anfärbung mit Ponceau S überprüft. Nach Entfernung des Farbstoffes durch ausgiebiges Waschen mit PBS/Tween 20 (0,05 %) wurden die Membranen zunächst über Nacht in Blockierungspuffer unter langsamen Schwenken bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Blockierungspuffer durch zweimaliges Waschen (je 3 min) entfernt und die Membranen für 60 min mit dem Primär-AK in Blockierungspuffer inkubiert. Es folgten 5 Waschschritte (je 5 min) und eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundär-AK (Maus-Ig-gekoppelte Peroxidase, Konzentration 1/10000), nach der erneut fünfmal (je 5 min) gewaschen wurde. Die Membranen wurden kurz abgetropft und 1 min in Substratlösung inkubiert, erneut abgetropft und in eine Filmkassette verbracht.

In einer Dunkelkammer wurde direkt im Anschluss ein Film in die Kassette eingelegt und in Abhängigkeit von der Intensität der Lumineszenz 2-180 min belichtet, bevor Entwicklung und Fixierung erfolgten.

2.3 Zellbiologische Methoden

Der im weiteren verwendete Begriff “Waschen” im Zusammenhang mit Zellsuspensionen bezeichnet den Vorgang des Auffüllens mit dem entsprechenden Medium, das Pelletieren durch Zentrifugation, das Verwerfen des Überstandes und die Resuspension.

Allgemein wurden Zellen bei 1600 RPM für 5 min bei RT zentrifugiert, abweichende Parameter sind angegeben.

2.3.1 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien bzw. gemischten Zellsuspensionen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 %-igem CO₂-Luftgehalt sowie 100 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Als Nährmedium für Suspensions- und adhärenz Zellen diente mit SC-Supplement komplettes RPMI bzw. bei Kultur und Transfektion von 293T-Zellen DMEM⁺. Zur DZ-Anreicherung wurde RPMI in einer speziellen Zusammensetzung (Dutch Modification) verwendet (s. 2.3.11).

Als Kulturgefäße dienten übliche Gewebekulturflaschen, -platten und -petrischalen.

Die für die Dauerkultur notwendige periodische Verdünnung von Zellen erfolgte bei Suspensionszellen durch Überführung eines kleinen Volumenanteils der Zellsuspension in frisches Medium. Adhärenz Zelllinien wurden nach Absaugen des Mediums zunächst mit ATV-Lösung bedeckt, nach erfolgter Ablösung zur Entfernung von ATV-Resten zweimal in Medium bzw. BSS/BSA gewaschen und schließlich wieder in Medium resuspendiert und zur weiteren Kultur entsprechend verdünnt.

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Suspension wurde je nach erwarteter Zellzahl ein Aliquot 1/2 bzw. 1/10 mit Trypanblau-Lösung vermischt, davon 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei konnten sowohl tote von lebenden Zellen unterschieden werden, als auch in gemischten Populationen eine orientierende Einschätzung des Anteils bestimmter Zellarten erfolgen.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eine geeignete Zahl von Zellen ($1 \cdot 10^6$ bis 10^7) in exponentieller Wachstumsphase wurde abzentrifugiert, in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und dieses in ein Kryoröhrchen überführt, das umgehend bei -70°C eingefroren und innerhalb eines Zeitintervalls von max. 6 Monaten zur dauerhaften Lagerung in eine -140°C-Gefriertruhe transferiert wurde.

Zur Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen zunächst bei 37°C im Wasserbad für eine Minute erwärmt und nach vollständigem Auftauen in 37°C warmes BSS/BSA überführt. Nach

Pelletierung durch Zentrifugation (1600 RPM, 5 min) wurden die Zellen in Nährmedium in Kultur genommen, wobei aufgrund des Einflusses der Zelldichte auf die Wachstumsbedingungen Verdünnungsreihen angelegt wurden, aus denen gut wachsende Ansätze zur Dauerkultur ausgewählt werden konnten.

2.3.3 Erstellen von Zellsuspensionen

Durch CO₂-Begasung getöteten LEW-Ratten wurden abhängig vom jeweiligen Versuch Thymus, Milz oder Lymphknoten entnommen und in Eis-gekühltem BSS gelagert. Die Organe wurden steril in einer 6-cm-Petrischale zunächst mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gerieben und die entstehende Suspension in einem Plastikröhrchen 5 min auf Eis gelagert. Die sich dabei am Boden ablagernden groben Gewebesteile wurden verworfen, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und dreimal mit BSS gewaschen. Die letzte Resuspension erfolgte in RPMI⁺, in dem die Zellen bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert wurden.

2.3.4 Stimulation des 53.4-T-Zellhybridoms durch immobilisierte Antikörper

In Näpfe einer 96-well-Flachbodenplatte wurden zunächst jeweils 50 µl SaMIg-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden nach 5-maligem Waschen mit BSS 100 µl eines 2. Ak hinzugegeben (hier R73 und R78) und 1 h inkubiert. Nach 6-maligem Waschen mit BSS wurden 1*10⁵ 53/4-Zellen in 100 µl RPMI⁺ hinzugegeben, über Nacht im Brutschrank inkubiert und der Kulturüberstand nach 24 h auf seinen IL-2-Gehalt getestet (s. 2.3.10).

2.3.5 Behandlung von Zellen mit Mitomycin C

Mitomycin C, das Produkt einer Streptomyces-Art, führt zu Quervernetzungen der DNA-Stränge durch Alkylierung, wodurch die für die DNA-Replikation notwendige Trennung der Stränge verhindert und die Vermehrung der Zellen gehemmt wird.

Suspensionszellen wurden vor ihrer Aussaat für die Stimulation zunächst dreimal mit auf 37°C vorgewärmtem BSS gewaschen und anschließend 45 min in 1 ml Mitomycin-C-Lösung (50 µg/ml in 37°C warmem BSS, maximal 1,7*10⁶ Zellen/ml) unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen viermal mit 37°C warmem RPMI⁺ gewaschen und entsprechend des Stimulationsprotokolls weiterverwendet.

Adhärente Zellen wurden erst einen Tag nach ihrer Aussaat behandelt, da durch Mitomycin C das Adhärenzvermögen der Zellen beeinträchtigt wird.

Das Waschen und die Inkubation wurden nach gleichem Protokoll in 24-well Platten durchgeführt, wobei pro Napf 0,4 ml Mitomycinlösung verwendet wurden.

2.3.6 Selektion transfizierter Zellen mit Geneticin (G418)

Geneticin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das ebenfalls die Proteinbiosynthese in Mitochondrien eukaryontischer Zellen inhibiert und dadurch zum Absterben der Zelle führt. Dadurch ist es möglich, Zellen, die erfolgreich mit für eine Geneticin-Resistenz kodierenden Vektoren transfiziert wurden, zu selektionieren.

Jeweils 3 Ansätze der zu behandelnden, adhärennten Zellen in DMEM⁺ wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen in 6-cm-TC-Petrischalen ausgesät und das Medium am folgenden Tag durch G418-haltiges DMEM⁺ in Konzentrationen von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 1,5 mg/ml G418 ersetzt.

Ein deutlicher zytotoxischer Effekt setzte meist nach zweitägiger Behandlung ein und war im Allgemeinen erst bei Konzentrationen ab 1 mg/ml zu beobachten

Nach 5-7 Tagen Kultur, während denen abgestorbene Zellen regelmäßig durch Waschen entfernt wurden, waren praktisch alle nicht resistenten Zellen abgetötet. Die Zellen wurden jedoch bis zu ihrer Verwendung weiterhin in Selektionsmedium gehalten, um einen Verlust des Resistenz-gekoppelten Gens zu vermeiden.

2.3.7 Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Gradient

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus einer gemischten Population wurde ein Volumen Zellsuspension einem gleichem Volumen Ficoll (beide RT) in einem 15 ml-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei RT und 400 g ohne Bremse. Die Interphase wurde abgenommen, dreimal in BSS/BSA gewaschen und die gewonnenen Zellen in Kulturmedium angezüchtet.

2.3.8 Stimulation von Lymphknotenzellen durch Superantigene/Mitogene

2.3.8.1 Bakterielle Superantigene

RT1B^L- bzw. RT1D^L-transfizierte L929-Zellen sowie Kontrollpopulationen (untransfizierte L929- und P3/2+CD80-Zellen) wurden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in 24-

well-Kulturplatten ausgesät (2 cm² Oberfläche/well) und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Mitomycin C (2.3.5) behandelt und mit durch Nylonwollsäulenpassage (2.3.13.1) und fakultativ Panning (2.3.13.2) gereinigten LEW-Lymphknotenzellen ($2 \cdot 10^6$ /ml) in 1,5 ml RPMI⁺ zusammengebracht.

Anschließend wurde Sag in einer Konzentration von 5 ng/ml (MAS) bzw. 2 µg/ml (SEC 1 und YPM) hinzugegeben und die Ansätze im Brutschrank inkubiert.

Nach 3 Tagen wurden die Zellen in 12-well-Platten mit frischem RPMI⁺ transferiert (zusätzlich Gabe von IL-2, 50 U/ml), 2 Tage im Brutschrank gehalten und am 5. Stimulationstag am FACS-Gerät analysiert.

Um die Wirksamkeit der Aufreinigung zu testen, wurden in einer ersten Versuchsreihe DZ einer Rattenmilz als Präsentatoren (2.3.11) für gereinigte LEW-T-Zellen verwendet. Dieser Versuch unterschied sich vom o.g. Ablauf dadurch, dass eine Behandlung mit Mitomycin C entfiel und nur YPM und MAS als Stimulatoren verwendet wurden. Verglichen wurde die Stimulation unter An- und Abwesenheit DZ und wahlweiser Zugabe von IL-2 (Aktivität 50 U/ml), das im Gegensatz zu o. g. Protokoll bereits am 1. Tag der Stimulation zugeführt wurde.

2.3.8.2 Virale Superantigene

V_{Sag7}-Gen-transfizierte und mittels G418 selektionierte L929 Zellen (nativ/RT1B^{l+}/RT1D^{l+}) sowie Kontrollpopulationen (3A5-Zellen, native/RT1B^{l+}-/RT1D^{l+}-L929-Zellen, die nur die G418-Resistenz, nicht aber das v_{Sag7}-Gen enthielten) wurden analog 2.3.8.1 ausgesät und mit Mitomycin C behandelt. Für die erste Stimulation wurde eine Dichte von $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm², für alle weiteren eine Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² gewählt.

2.3.8.1 entsprechend wurden sowohl ungereinigte (1.Stimulation) als auch durch Nylonwollsäulenpassage behandelte LEW-Lymphknotenzellpopulationen (folgende Stimulationen) eingesetzt und die Ansätze im Brutschrank kultiviert.

Die Suspensionszelllinien LBB 3.4.16 (mtv7⁺) und LBB II.V.11 (mtv7⁻) wurden nach 2.3.5 mit Mitomycin C behandelt und jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen (in 100 µl) in 96-well-Rundbodenplatten mit $2 \cdot 10^5$ durch Nylonwollsäulenpassage behandelten Lymphknotenzellen (ebenfalls in 100 µl) im Brutschrank inkubiert. Entsprechend 2.3.8.1 wurden die Ansätze nach 3 Tagen in 24-well-Platten mit frischem Medium (50 U IL-2/ml) transferiert und nach 2 weiteren Tagen Inkubation am FACS-Gerät analysiert.

In gemischten Ansätzen wurden analog vorbereitete MHC-Klasse-II⁻, v_{Sag7}^{+/+}-L929-Zellen ($1 \cdot 10^5$ /cm²) mit gereinigten LEW-Lymphknotenzellen und Mitomycin C behandelten LBB II.V.11-Zellen ($2 \cdot 10^5$ /Ansatz) zusammengebracht und gemäß 2.3.8.1 weiterbehandelt. Analog wurden Ansätze mit zunächst LPS-stimulierten (2.3.8.4) und anschließend Ficoll-gereinigten (2.3.7) LEW-Milzzellen ($4 \cdot 10^5$ /Ansatz) an Stelle von LBB IIV11-Zellen getestet.

2.3.8.3 Concanavalin A (ConA)

ConA ist ein Mitogen verschiedener Canavalia-Arten, das T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität und V β -Zugehörigkeit zur Mitose anregt.

Entsprechend 2.8.3.1 wurde es bei ansonsten identischem Protokoll in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ anstelle eines Sag eingesetzt.

2.3.8.4 Lipopolysaccharid (LPS)

Milzzellsuspensionen aus LEW-Ratten bzw. BALB/c-Mäusen wurde in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml ausgesät und LPS in einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ zugefügt. Nach 2-tägiger Inkubation wurden lebende von toten Zellen mittels Ficoll-Gradienten (s. 2.3.7) getrennt und in TZH- oder polyklonalen Stimulationen eingesetzt.

2.3.9 Stimulation von T-Zellhybridomen

2.3.9.1 Bakterielle Superantigene

RT1B⁺- bzw. RT1D⁺-L929-Zellen sowie Kontrollpopulationen (untransfizierte L929- und P3/2+CD80-Zellen) wurden in einer Konzentration von 25000 Zellen/Napf in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und $5 \cdot 10^4$ 53.4-Zellen sowie das zu testende Superantigen (beide in RPMI⁺) zu einem Endvolumen von 200 μl hinzugegeben. SEB, SEC 1, 2 und 3 sowie YPM wurden in 6 bzw. MAS in 4 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz aus zu testender Zellart und Hybridom ohne Sag.

Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände auf ihren IL-2-Gehalt untersucht (s. 2.3.10).

2.3.9.2 Virale Superantigene

Entsprechend der Konzentration von 2.3.9.1 wurden adhärente Zellen aus 2.3.8.2 in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und durch $5 \cdot 10^4$ RG17-Zellen in 200 μl RPMI⁺ ersetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz von RG17-Zellen ohne Präsentatoren.

Nicht adhärente LBB 3.4.16-Zellen ($5 \cdot 10^4$ /well) wurden mit RG17-Zellen ($5 \cdot 10^4$ /well) in einer 96-well-Rundbodenplatte in 200 μl zusammengebracht.

Des Weiteren wurden MHC-Klasse-II⁻, vSag7^{+/-}-L929-Zellen und RG17 in gleichen Zellzahlen mit LBB IIV11- ($2,5 \cdot 10^4$ /well) oder LPS-behandelten (s. 2.3.8.4) und anschließend

Ficoll-gereinigten (s. 2.3.7) BALB/c- bzw. LEW-Milzzellen (jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen/well) gemischt (300 μ l).

Hier erfolgte nach 48, ansonsten bereits nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank ein Test der Überstände auf ihren IL-2-Gehalt.

2.3.9.3 gpMBP

Dem Stimulationsprotokoll 2.3.9.1 ansonsten vollständig entsprechend wurde anstelle eines Sag guinea pig (gp) MBP in 6 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

2.3.9.4 L.casein

L.casein ist ein in Säugetiermilch enthaltenes Eiweiß, dessen Fragmente nach Endozytose und intrazellulärem Verdau auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden können.

Die unter 2.3.9.1 erwähnten adhärenen Zellen wurden ausgesät und entsprechend kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium durch L.casein in 4 unterschiedlichen Konzentrationen und $5 \cdot 10^4$ Zellen des L.casein-spezifischen Klons 19, beide in insgesamt 200 μ l RPMI⁺, ersetzt. Zur Positivkontrolle wurden $1 \cdot 10^6$ Thymuszellen in 96-well-Rundbodenplatten mit $5 \cdot 10^4$ Zellen Klon 19 verbracht und mit gleichen L.casein-Konzentrationen inkubiert (Endvolumen ebenfalls 200 μ l).

Auch hier erfolgte nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank ein Test der Überstände auf IL-2-Gehalt.

2.3.9.5 Phorbolmyristatacetat (PMA) und Ionomycin

Beide Substanzen bewirken in der Zelle eine Erhöhung des zytoplasmatischen Calcium-Gehalts, im Fall von Ionomycin vermutlich direkt durch eine erhöhte Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Wirkung als Ionophor), bei PMA durch Aktivierung von an der Calciumeinstromregulation beteiligten Proteinen (z.B. Proteinkinase C).

Dieser Effekt wurde zur Kontrolle der IL-2-Produktion der verwendeten Hybridome (53.4, Klon 19, RG17) benutzt, da über die Calciumerhöhung im Zytoplasma eine vermehrte IL-2-Bildung und -Freisetzung vermittelt wird.

2.3.10 ELISA

Die Bestimmung des IL-2-Gehalts eines Stimulationsansatzes wurde durch einen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) durchgeführt. Bei diesem werden IL-2-Moleküle zunächst an immobilisierte AK gebunden. In einem zweiten Schritt wird ein Enzym-konjugier-

ter AK, der für ein anderes IL-2-Epitop spezifisch ist, hinzugegeben. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, deren Stärke mit der Menge des gebundenen AK und damit der vorhandenen IL-2-Moleküle proportional ist. Aus der in Ansätzen bekannter Konzentration gemessenen Extinktion kann somit der IL-2-Gehalt unbekannter Ansätze ermittelt werden.

Überstände aus Hybridomstimulationen wurden nach der Inkubationszeit in neue 96-well-Rundbodenplatten überführt und bei 2000 RPM 5 min zentrifugiert, um noch enthaltene Zellen zu pelletieren. Die gereinigten Überstände wurden entweder direkt auf ihren IL-2-Gehalt getestet oder nach erneuter Überführung in frische Platten bei -20°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert.

Die Bestimmung der IL-2-Konzentration erfolgte mit Hilfe des BD Biosciences OptEIA IL-2 Kits. Dazu wurde am Vortag eine 96-well-halfsize-ELISA-Platte mit der angegebenen Verdünnung des Capture-AK in Coating-Puffer beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 (>150 µl/Napf) wurden zunächst freie Bindungsstellen der Platte für 1 h mit PBS/10% FCS blockiert und nach erneutem dreimaligem Waschen eine Verdünnungsreihe des Standards mit bekannten Konzentrationen sowie die zu analysierenden Kulturüberstände in einem Volumen von jeweils 50 µl aufgetragen.

Nach zweistündiger Inkubation und fünfmaligem Waschen wurden je 50 µl einer Verdünnung des Detektions-AK und des Avidin-Peroxidase-Konjugats in PBS/10%FCS hinzugegeben und erneut 1 h inkubiert.

Nach abschließendem siebenmaligen Waschen wurden jeweils 50 µl Substratlösung hinzugegeben und für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch Hinzugabe von 25 µl 2M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion des Farbstoffes innerhalb von 30 min am ELISA-Reader gemessen.

2.3.11 Anreicherung dendritischer Zellen im Metrizamid-Gradienten

Im Gegensatz zur normalen Erstellung von Einzelzellsuspensionen wurde eine entnommene Milz mit einem Spritzenstempel zerstampft und sowohl Gewebsreste als auch die entstandene Suspension über Nacht in einer 50 ml-Kulturflasche mit Dutch RPMI (10% FCS) im Brutschrank gelagert (*Macatonia et al., 1989*).

Über Nacht wurden enthaltene Makrophagen an der Kunststoffoberfläche adhärent, während dendritische und andere Zellen durch vorsichtiges Resuspendieren wieder in Lösung übergingen und abgenommen werden konnten.

Das abgenommene Volumen wurde in kleinen Zentrifugenröhrchen auf 2 ml Metrizamid-Lösung (14,5 g/100 ml Dutch RPMI⁺) geschichtet und für 10 min bei 600 g ohne Abbremsen zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und Metrizamidreste durch dreimaliges Waschen in Medium entfernt. Der DZ-Anteil konnte bei der Zellzahlbestimmung im Mikroskop durch deren sternförmige Morphologie bestimmt werden.

2.3.12 Grenzverdünnung (limited dilution)

Zur Gewinnung einzelner Zellklone wurde ein Aliquot einer Zellsuspension bis zu einer rechnerischen Konzentration von 3 Zellen/ml in Medium verdünnt.

Hiervon wurden je 100 µl/Napf in 96-well-Rundbodenplatten ausgesät und nach einer Woche auf Wachstum überprüft. Durch die Verdünnung konnte jede Zellpopulation mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf eine einzige Zelle zurückgeführt werden.

2.3.13 Anreicherung von T-Zellen

Um bei Stimulationen von Lymphknotenzellen durch MHC-Klasse-II-Transfektanten den Einfluss von in der Lymphknotenzellsuspension enthaltenen RT1B^L-/RT1D^L-positiven Zellen möglichst gering zu halten und dadurch eine Untersuchung der Präsentationseigenschaften bestimmter MHC-Klasse-II-Arten zu ermöglichen, wurden 2 Verfahren angewendet.

2.3.13.1 Nylonwollsäulenpassage

In eine 20ml-Spritze wurden 1,2 g Nylonwolle fein ausgezupft und autoklaviert. Zur Verwendung wurde die Säule zunächst mit BSS/5 % FCS äquilibriert und auf 37°C vorgewärmt, bevor die aufzureinigenden Zellen in einem ebenfalls vorgewärmten Volumen von 2,5 ml BSS/5 % FCS in die Säule einlaufen gelassen wurden. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C im Brutraum wurden die Zellen mit einer Geschwindigkeit von 30 Tropfen/min mit 5-15 ml warmen BSS/5 % FCS eluiert. Die Geschwindigkeit der Elution bestimmt maßgeblich den Aufreinigungsgrad, der mit langsamerer Geschwindigkeit, allerdings auf Kosten der Zellzahl, ansteigt.

MHC-Klasse-II-positive Zellen blieben durch ihre besonderen Adhärenzeigenschaften an der Nylonwolle bevorzugt in der Säule zurück, während vor allem T-Lymphozyten von dieser Passage unbeeinflusst blieben und eluiert wurden. Der Anteil MHC-Klasse-II-positiver Zellen konnte auf diese Art auf weniger als 10 % des Ausgangswertes gesenkt werden.

2.3.13.2 Panning

Bei dieser Methode werden Zellen mit AK gegen bestimmte Oberflächenmerkmale inkubiert, so dass Merkmal-positive Zellen bei AK-Bindung durch immobilisierte AK zurückgehalten und aus einer Population entfernt werden können.

Petrischalen (Ø 9 cm) wurden am Vortag mit SaMIg in Coating-Puffer benetzt und über Nacht bei 4°C gelagert. Vor der Benutzung wurde der Überstand zur erneuten Verwendung abgenommen und die Schalen sechsmal mit BSS gewaschen.

Die zu behandelnde Lymphknotenzellsuspension war bereits durch Nylonwollsäulenpassage aufgereinigt und danach mit Anti-MHC-Klasse-II-AK in einer Konzentration von 20 µg/ml in 2 ml für 30 min gefärbt worden.

Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen, in einem Volumen von 5 ml resuspendiert und für 1 h auf die Platte bei 4°C gegeben.

Anschließend wurde das Medium abgenommen und die nicht auf der Plattenoberfläche haftenden Zellen durch viermaliges vorsichtiges Abspülen in Medium aufgenommen und weiterverwendet.

2.3.14 In-vivo-Stimulation durch virale Superantigene

$1,5 \cdot 10^7$ MHC-Klasse-II⁻, vSag7^{+/-}-L929-Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen und dieses subkutan in die linke Fußsohle von LEW-Ratten injiziert. Nach 4 Tagen wurden die Tiere durch CO₂-Begasung getötet und die drainierenden poplitealen Lymphknoten sowohl auf der Applikations- als auch der Gegenseite entnommen. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden mittels Durchflusszytometrie auf vSag7-spezifische Veränderungen hin analysiert.

2.3.15 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Zellproteinen. Dabei werden Fluoreszenz-markierte AK verwendet, die entweder direkt gegen die zu analysierenden Merkmale gerichtet sind oder die als Anti-Igs an nicht-markierte spezifische AK binden und diese dadurch nachweisen können.

Nach der im Weiteren beschriebenen Färbung wurden die Zellpopulationen am FACScanII-Gerät untersucht. Die Suspension wird dabei im Gerät so verdünnt, dass die Zellen in einem feinen Flüssigkeitsstrahl hintereinander an einem Laserstrahl vorbeigeleitet werden können.

Das vom Laser emittierte Licht wird dabei einerseits zu einem gewissen Teil seitlich gestreut (side scatter) oder bleibt in seiner Richtung unbeeinflusst (forward scatter) und regt andererseits die Fluoreszenzstoffe der AK zur Photonenemission an. Sowohl die Streuung als auch die Fluoreszenz werden von Photodetektoren registriert, wobei die Stärke der Fluoreszenz mit der Menge des gebundenen AK und die Streuung im Fall des forward scatters mit der Größe bzw. im Fall des side scatters mit der Zellgranularität (antiproportional zur Vitalität) proportional ist. Die Streuungsparameter dienen der Unterscheidung zwischen lebenden und toten, aber auch lebender Zellen untereinander und erlauben eine Fluoreszenzanalyse in verschiedenen Populationen durch Festlegung so genannter Gates in der Auswertung (hier durch CellQuest-Software).

2.3.15.1 Analyse von Oberflächenantigenen

Allgemein wurden AK in austitrierten, gesättigten Konzentrationen verwendet. Die pro Färbeansatz verwendete Zellzahl lag bei max. $0,5 \cdot 10^6$ Zellen, Färbung und Messung erfolgte in PP-FACS-Röhrchen.

Einfarbenimmunfluoreszenz

indirekt Fluoreszenz-markierter Antikörper

- Zugabe des unkonjugierten AK
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer
- Zugabe von DaMIg-PE
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer und Analyse

direkt Fluoreszenz-markierter Antikörper

- Zugabe des PE- oder FITC-konjugierten AK
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer und Analyse

biotinylierter Antikörper

- Zugabe des biotinylierten AK
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer
- Zugabe von Streptavidin-Cyochrome
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer und Analyse

Zweifارbenimmunfluoreszenz

- zunächst Durchführung einer *Einfarbenimmunfluoreszenz*
- Zugabe von nMIg (Endkonzentration 1 µg/100 µl)
- 10 min Inkubation
- Zugabe des 2., konjugierten AK
- 20 min Inkubation bei 4°C
- Waschen mit FACS-Puffer und Analyse

2.3.15.2 Analyse intrazellulärer Proteine

Neben der Analyse von Oberflächenantigenen durch Durchflusszytometrie ist es ebenfalls möglich, Proteine in intrazellulären Kompartimenten mittels Fluorochrom-markierter AK nachzuweisen.

Hierfür wurden in einem 1. Schritt die Zellen eines Färbeansatzes ($0,5 \cdot 10^6$ in 100 μ l FACS-Puffer) mit einem monoklonalen unkonjugierten AK gegen RT1D^l 20 min bei 4°C inkubiert und danach einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Dieser AK blockiert oberflächliche Zellmoleküle, um eine spätere positive Fluoreszenz dem Zellinneren zuordnen zu können. Um den Erfolg zu überprüfen, wurde ein derart geblockter Ansatz RT1D^{l+}-Zellen nachfolgend mit einem PE-konjugierten AK derselben Spezifität nach gleichem Schema inkubiert, gewaschen und am FACS-Gerät analysiert. War keine positive Fluoreszenz sichtbar, so war von einer ausreichenden Blockade auszugehen.

Die weiteren Färbeansätze wurden nun zunächst in Formaldehyd fixiert und dann mit 0,8 ml 5%-iger Saponinlösung (in PBS/0,1% BSA) gewaschen.

Es folgte eine 30-minütige Inkubation in derselben Lösung bei 4°C, durch die die Zelloberfläche durchlässig wurde.

Daraufhin wurde der PE-konjugierte AK in üblicher Färbekonzentration hinzugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Erneut wurde zweimal mit 0,8 ml Saponin-Lösung gewaschen, die Ansätze mit 100 μ l FACS-Puffer aufgefüllt und am FACS-Gerät analysiert.

2.3.15.3 Anreicherung von Zellpopulationen durch FACSort

Durch Fluoreszenzfarbstoffe gegen bestimmte Zellmerkmale markierte Zellen können im Rahmen der Durchflusszytometrie auch gezielt ausgewählt werden. Erfüllt eine Zelle in der Messung die Kriterien für eine Selektion wird der die Zelle enthaltene Flüssigkeitstropfen unmittelbar nach Durchlaufen des Laserstrahls durch ein Magnetfeld polarisiert und in einem zweiten Magnetfeld so abgeleitet, dass er in einem separaten Gefäß aufgefangen wird.

Zellen wurden entsprechend dem Protokoll für Einfarbenimmunfluoreszenz in einer Zelldichte von maximal $2 \cdot 10^6/100 \mu$ l mit einer gesättigten AK-Lösung inkubiert.

Sämtliche Medien mussten steril und frei von Natriumazid sein, um die Zellen nach erfolgtem Sort weiter kultivieren zu können. Die Anzahl der gefärbten Zellen richtete sich nach dem prozentualen Anteil der zu selektionierenden Zellen an der Gesamtpopulation und der für die jeweiligen Versuche benötigten Zellzahl. Zu beachten blieb ebenfalls, dass 50 % der ausgewählten Zellen direkt oder im Anschluss an den Sort abstarben.

Die Zellen wurden bereits während des Sorts wieder in RPMI⁺ suspendiert und nach Abschluss in Kultur genommen.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit sollte die Präsentation von MHC-Klasse-II-Molekülen der LEW-Ratte bezüglich Sag bakterieller und viraler Herkunft sowie definierter Peptidantigene charakterisieren. Ein Schwerpunkt dabei war der Vergleich zwischen RT1B^l und RT1D^l sowie zwischen diesen und humanen MHC-Klasse-II-Molekülen.

Zunächst wurden Zelllinien mit MHC-Klasse-II-Kettengenen und fakultativ mit der orf-Sequenz von mtv7 transfiziert. Bei Nachweis einer Oberflächenexpression bzw. einer erfolgreichen vSag7-Genübertragung wurden die Transfektanten einem Test auf Sag-Präsentationsfähigkeit gegenüber aufgereinigten LEW-T-Zellen (s. 2.3.8) und einem TZH (s. 2.3.9) unterzogen.

Die Expression gemischter Isotypen als ein weiterer Aspekt dieser Arbeit sollte einerseits Aufschluss über die Generierungsmöglichkeit solcher Moleküle in der LEW-Ratte geben und gleichzeitig erlauben, mit Hilfe dieser Heterodimere die Bindung verschiedener Sag an die Einzelketten von RT1B^l bzw. RT1D^l zu untersuchen. Hierfür wurden verschiedene Zelllinien mit zwei MHC-Klasse-II-Einzelkettengenen in physiologischer oder isotypisch gemischter Zusammensetzung transfiziert und die Oberflächenexpression der Ansätze verglichen. Im Weiteren wurde bei einer der erstellten Zelllinien ein MHC-Klasse-II-Molekülnachweis mittels Western Blot nach SDS-PAGE (2.2.13 und 2.2.12) und einer intrazellulären Färbung (s. 2.3.15.2) durchgeführt.

3.1 Präsentation von Antigenen und Superantigenen durch LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle

3.1.1 Die Stimulation gereinigter T-Zellen durch die untersuchten bakteriellen Sag ist abhängig von der Anwesenheit Antigen-präsentierender Zellen

Um Unterschiede der beiden untersuchten LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle in der Präsentation von Sag festzustellen, war es essentiell, den Anteil MHC-Klasse-II-positiver Zellen in den zu stimulierenden Lymphknotenzellsuspensionen so weit zu reduzieren, dass diese keinen bedeutenden Beitrag mehr zur Präsentation leisteten. Dafür war es zunächst notwendig, die verwendeten Zellaufreinigungsmethoden auf ihre Wirksamkeit zu prüfen.

Gemäß 2.3.11 wurden aus einer Rattenmilz DZ gewonnen, die anschließend als Präsentatoren für durch Nylonwollsäulenpassage und Panning aufgereinigte T-Zellen (s. 2.3.13) dienten. Die Stimulation erfolgte wie in 2.3.8.1 beschrieben.

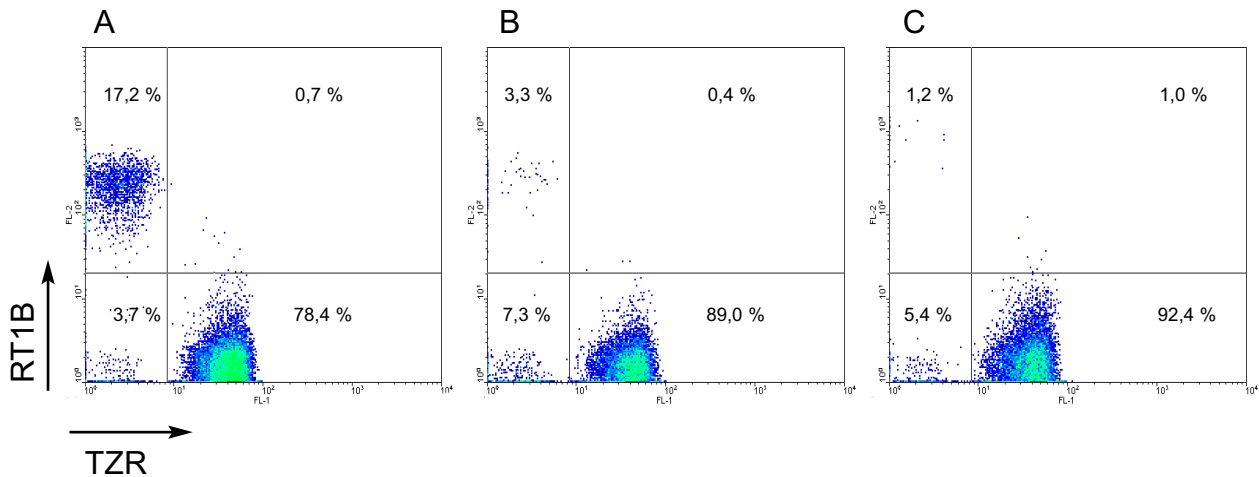


Fig. 1: Zusammensetzung der Lymphknotenzellsuspension vor (A) und nach (B) Nylonwollsäulenpassage bzw. nach Panning (C), Zweifarbenfluoreszenz mit Anti-RT1B β - und -Ratten-C β -TZR-AK

Fig. 1 stellt den Effekt der verwendeten Aufreinigungsmethoden dar. Zeigte sich in einer unbehandelten Lymphknotenzellsuspension noch ein Anteil RT1B⁺-Zellen von 17,3 %, so wurde dieser mittels Nylonwollsäulenpassage auf 3,3 % abgesenkt und durch Panning noch zusätzlich um fast zwei Drittel reduziert. In der Auswertung wurden zwei Rechenwerte als Marker für eine Stimulation eingesetzt (s. Fig. 2).

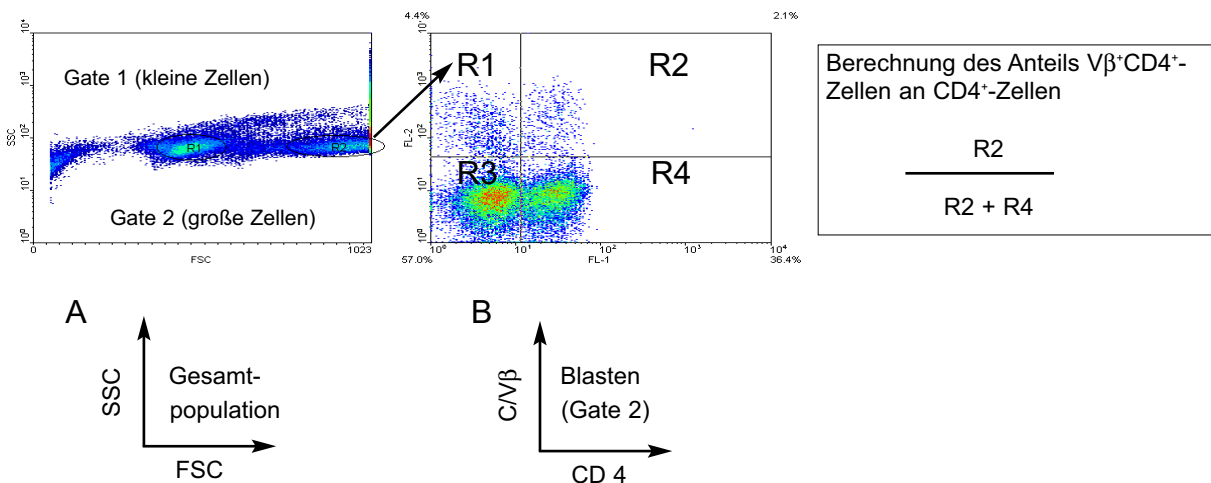
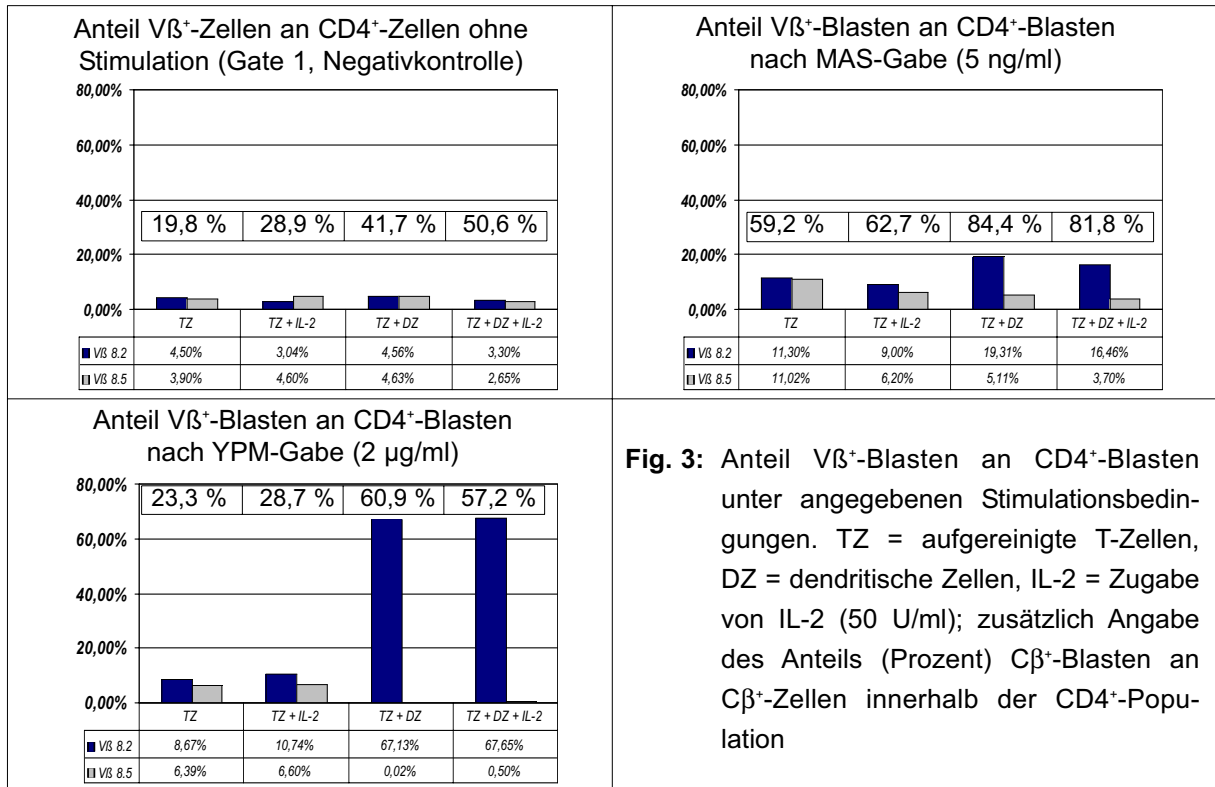


Fig. 2: Berechnung von Stimulationsmarkern. In der Gesamtpopulation wurden zunächst die stimulierten Zellen anhand ihrer Größe identifiziert (Gate 2) und innerhalb dieser Gruppe V β gegen CD4 gefärbt (B), woraus der Anteil einer V β -Gruppe an CD4⁺-Zellen berechnet wurde (s. Kasten). Als Stimulationssachweis wurde eine Zunahme Sag-spezifischer V β -Gruppen mit gleichzeitiger Abnahme nicht stimulierter V β s gegenüber der Konfiguration in einem unstimulierten Ansatz gewertet. Als Bestätigung diente der Nachweis eines erhöhten Blastenanteils in der C β ⁺CD4⁺-Gesamtpopulation (C β ⁺CD4⁺ in Gate 2 geteilt durch C β ⁺CD4⁺ in Gate 1 und 2)



In Fig. 3 ist die Vβ-Verteilung innerhalb der CD4⁺-Population unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen dargestellt. Wie zu erwarten, zeigten sich innerhalb der Negativkontrolle nur geringe Differenzen im Anteil Vβ8.2⁺- und 8.5⁺-Zellen. Unter Zugabe von MAS erhöhte sich der Anteil Vβ8.2⁺-Zellen in Gegenwart DZ um fast 100 %, während der Vβ8.5⁺-Anteil abnahm, allerdings immer noch über den Werten der Negativkontrolle lag und daher für eine Stimulation von Vβ8.5 durch MAS spricht. Auch in DZ-Abwesenheit ließen sich diese Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle erkennen, so dass davon auszugehen ist, dass durch den Restanteil MHC-Klasse-II⁺-Zellen eine im Vergleich zu den Ansätzen mit DZ allerdings geringere Stimulation getragen wird.

Besonders ausgeprägt waren die Veränderungen bei Stimulation mit YPM. Gegenüber der Negativkontrolle zeigte sich massiver Anstieg der Vβ8.2⁺-Population, die in Anwesenheit von DZ knapp 70 % der CD4⁺-Blasten ausmachte, während die Vβ8.5⁺-Untergruppe auf fast nicht mehr nachweisbare Werte zurückging. Diese Veränderungen ließen sich in geringerem Umfang auch in DZ-Abwesenheit beobachten und weisen ebenfalls auf einen Beitrag der MHC-Klasse-II⁺-Restpopulation in aufgereinigten T-Zellen an der Sag-Präsentation hin. Die Zugabe von IL-2 in den Versuchsansätzen führte in keinem der getesteten Ansätze zu einem unterschiedlichen Ergebnis.

Gegenüber diesen zum Teil sehr ausgeprägten Unterschieden waren die Veränderungen des Blastenanteil innerhalb der CD4⁺-Population deutlich geringer ausgeprägt.

Bereits in der Negativkontrolle zeigte sich eine Erhöhung des Blastenanteils in DZ-Gegenwart und IL-2-Zugabe.

In Anwesenheit von MAS führte die DZ-Präsenz zu einem Anstieg des Blastenteils um ca. 20 % gegenüber aufgereinigten T-Zellen ohne APZ, wobei allerdings in diesen Ansätzen der Blastenteil bereits zwischen 30-40 % höher lag als in der Negativkontrolle.

Unter YPM-Stimulation waren die Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle in Nur-T-Zellansätzen sehr gering, dagegen kam es bei DZ-Anwesenheit zu einem ausgeprägten Anstieg des Blastenteils in CD4⁺-Zellen um etwa 30 %, aber nur um 10 % gegenüber der Negativkontrolle.

Die Ergebnisse dieses ersten Versuchs zeigten, dass die Verwendung aufgereinigter LEW-T-Zellen in einer Sag-Stimulation es erlauben würde, eine Präsentation durch zusätzlich zugefügte potentielle Präsentatoren, also RT1B^l- bzw. RT1D^l-Transfektanten, zu analysieren. Allerdings zeigte sich auch, dass trotz massiver Reduktion MHC-Klasse-II⁺-Zellen in der Lymphknotenzellpopulation durch die verwendeten Aufreinigungsmethoden ein sichtbarer Beitrag dieser Gruppe in der Sag-Präsentation bestehen blieb.

3.1.2 Expression von RT1B^l bzw. RT1D^l in LEW-MHC-Klasse-II-transfizierten L929-Zellen

Zur Expression der klonierten Ratten-MHC-Klasse-II-Gene wurde die L929-Zelllinie gewählt. Diese Maus-Fibroblasten exprimieren keine H2-A/E-Moleküle auf ihrer Oberfläche und sind grundsätzlich zur Prozessierung exogener Proteine fähig (*Germain et al., 1987*).

Zur Übertragung der Zielgene wurde der unter 2.2.11.2 beschriebene retrovirale Gentransfer verwendet. Um eine möglichst homogene und damit gut vergleichbare Expression zu erreichen, wurden MHC-Klasse-II⁺-Zellen durch FACSsort (s. 2.3.15.3) angereichert, bevor sie als Stimulatoren Verwendung fanden.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer Oberflächenanalyse durch Durchflusszytometrie (2.3.15.1) nach Transfektion.

Die verwendeten AK 14-4-4S und Ox6 sind gleichzeitig kreuzreagierend mit Maus- MHC-Klasse-II-Molekülen, wobei Ox6 die β -Kette von H2-A (RT1B-Homolog) und 14-4-4S die α -Kette von H2-E (RT1D-Homolog) bindet.

Auf diese Weise konnte also nicht nur das Vorhandensein der RT1B^l-/RT1D^l-Kettengene nachgewiesen, sondern gleichzeitig auch die fehlende H2-A/E-Expression bestätigt werden.

Fig. 4 (s. nächste Seite) zeigt die fehlende Expression von Maus- und Ratten-MHC-Klasse-II-Molekülen in nicht transfizierten L-Zellen. Nach Übertragung der Einzelkettengene wiesen die jeweiligen Zelllinien zu über 94 % eine RT1B^l-/RT1D^l-Oberflächenexpression ähnlicher Intensität bei gleichzeitigem Fehlen des jeweils anderen Isotyps auf.

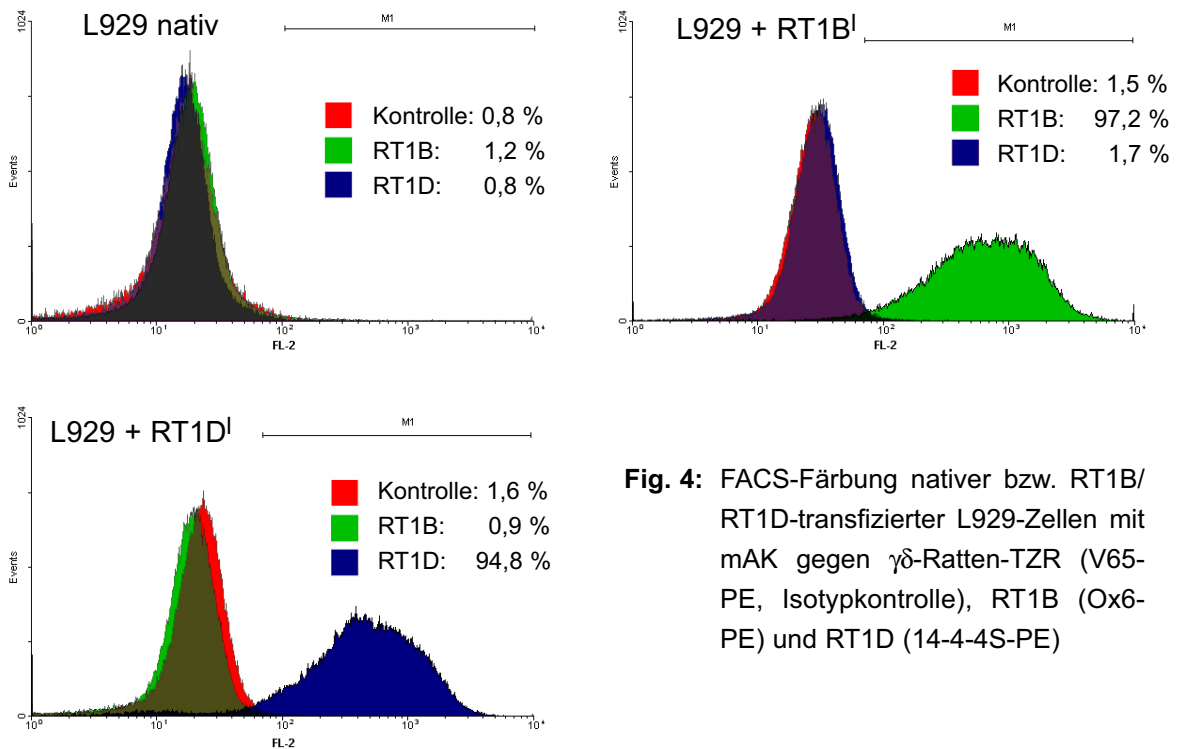


Fig. 4: FACS-Färbung nativer bzw. RT1B/RT1D-transfizierter L929-Zellen mit mAK gegen $\gamma\delta$ -Ratten-TZR (V65-PE, Isotypkontrolle), RT1B (Ox6-PE) und RT1D (14-4-4S-PE)

3.1.3 Unterschiede in der Reaktivität von TZH gegenüber RT1B^I-, RT1D^I- und HLA-DR1-präsentierten Superantigenen und Antigenen

Die in 3.1.2 beschriebenen Zelllinien wurden auf ihre Präsentationsfunktion gegenüber reaktiven TZH untersucht. Als Positivkontrolle diente mit Ausnahme der L.casein-Stimulation die Zelllinie P3/2+CD80, die neben HLA-DR1 zusätzlich das kostimulatorische Ratten-CD80 trägt und auf DAP3-Fibroblasten zurückgeht. Die Präsentationsfähigkeit dieser Zelllinie (ohne CD80) für verschiedene SE wurde von *Herrmann et al. (1994)* beschrieben.

Als reaktives TZH in den Ansätzen mit den Superantigen SEB, SEC1-3, YPM und MAS sowie gpMBP wurde die 53/4-Zelllinie verwendet, deren TZR ($V\beta 8.2^+$) mit den oben genannten Sag und RT1B^I-restringiert mit gpMBP interagieren kann.

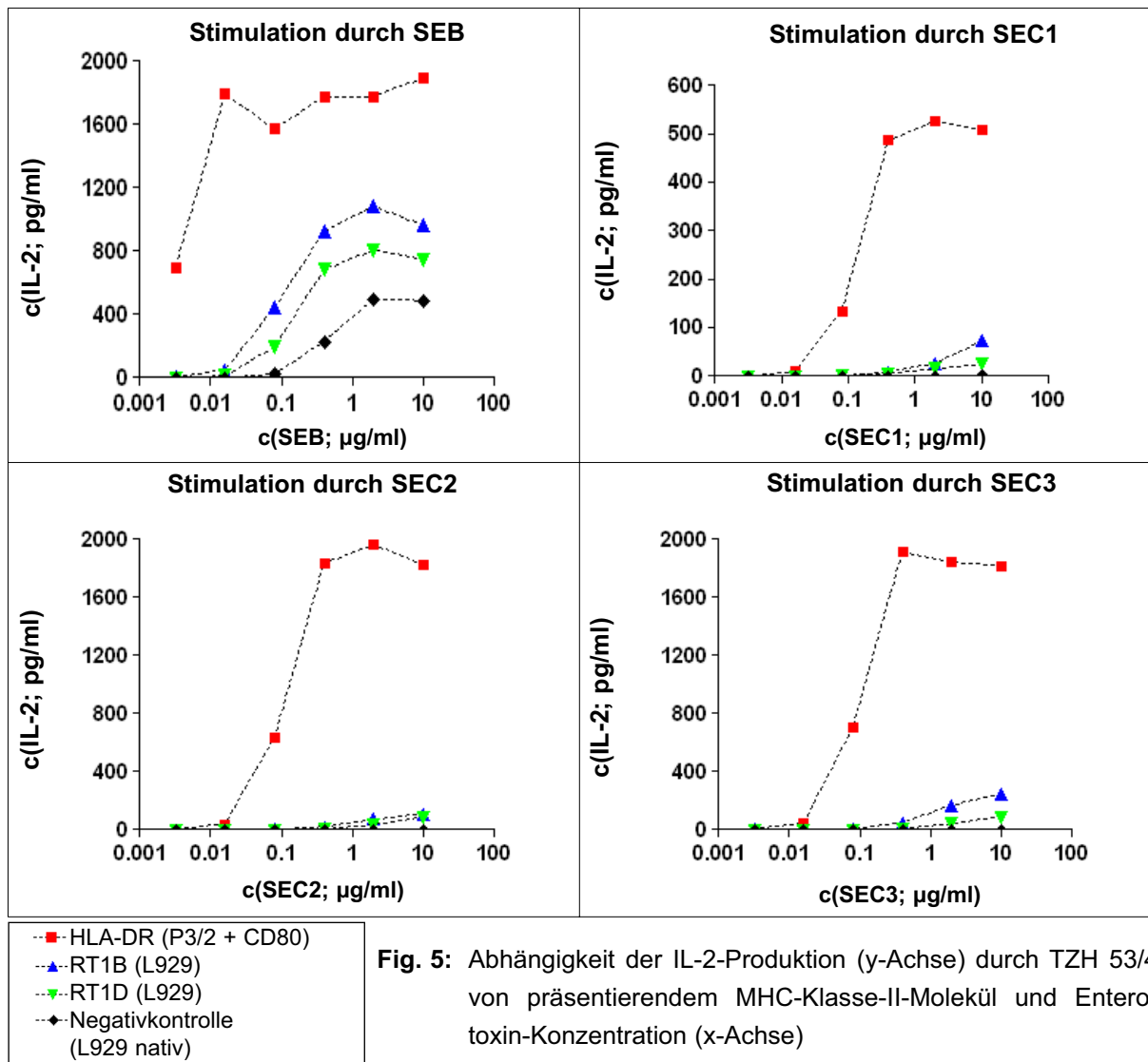
Als zu stimulierende Zelllinie bei L.casein-Präsentation wurde das reaktive TZH Klon 19 und als Positivkontrolle LEW-Thymozyten als Präsentatoren eingesetzt, wobei in der heterogenen Population der Thymuszellen die Antigenpräsentation von RT1B^I- und RT1D^I-positiven dendritischen und Epithelzellen wahrgenommen wird.

Der detaillierte Ablauf der 53/4-Stimulation ist unter 2.3.9.1 (Sag) und 2.3.9.3 (gpMBP) beschrieben bzw. für L.casein unter 2.3.9.4.

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Überstände mittels ELISA auf ihren IL-2-Gehalt hin untersucht (s. 2.3.10), der als Indikator für eine TZH-Reaktion auf präsentierte Sag und Antigene diente.

Die Fähigkeit der TZH zur IL-2-Produktion wurde vor der eigentlichen Versuchsdurchführung durch immobilisierte AK gegen die TZR β -Kette (R73) bzw. bei 53/4 zusätzlich gegen TZR-V β 8.2 (R78) getestet (s. 2.3.4) und in den späteren Analysen eine Aktivierung mit PMA/Ionomycin (s. 2.3.9.5) zur Bestimmung der maximalen IL-2-Produktion durchgeführt (beides nicht gezeigt).

3.1.3.1 Reaktivität gegenüber Staphylokokken-Enterotoxinen



Die Reaktivität von 53/4 (Fig. 5) gegenüber den untersuchten Enterotoxinen war bei Präsentation durch HLA-DR1 wesentlich ausgeprägter als bei LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen. Dies war vor allem bei SEC-Sag gut zu beobachten, bei denen die IL-2-Produktion um das 10-20-Fache höher lag. Unter HLA-DR1-Präsentation war schon bei geringen Sag-Konzentrationen eine sehr hohe 53/4-Antwort festzustellen, die bei SEC-Konzentrationen von über 0,4 µg/ml bzw. bei SEB-Konzentrationen über 0,016 µg/ml ein Plateau aufwies.

Die IL-2-Antwort verhielt sich bei SEB und RT1B^L/RT1D^L-Präsentation ähnlich der

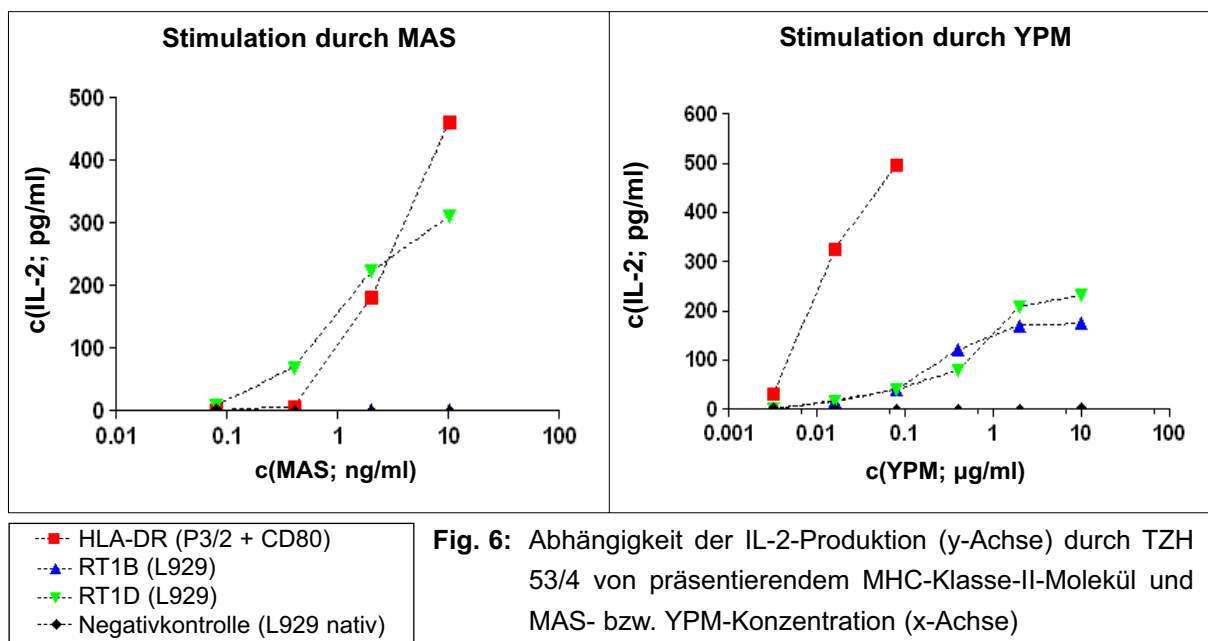
Präsentation durch humanes MHC-Klasse-II, hingegen führte die Stimulation mit SEC1-3 zu einem Dosis-abhängigen Anstieg der IL-2-Produktion bis zur Sag-Maximalkonzentration bei 10 µg/ml.

Innerhalb der LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle ließ sich besonders bei SEB- und SEC3-Stimulation eine verstärkte Antwort des TZH in Gegenwart von RT1B^l beobachten.

Auffällig ist die IL-2-Produktion in Gegenwart nativer L929-Zellen bei Zugabe von SEB. Im Unterschied zu SEC1-3, bei denen diese Zellen nicht stimulierten, zeigte sich hier eine der 53/4-Reaktion auf RT1B^l-/RT1D^l-Transfektanten ähnliche IL-2-Antwort, die fast 50 % der Werte unter RT1B^l-Präsentation erreichte.

Nachdem die Nichtexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen in nativen L929-Zellen durch eine Durchflusszytometrie erneut bestätigt werden konnte, ergab die Wiederholung der SEB-Stimulation ein vergleichbares Ergebnis (nicht gezeigt).

3.1.3.2 Reaktivität gegenüber MAS und YPM



Anders als bei SE war der beobachtete Unterschied zwischen humanen und LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen bei MAS-Stimulation wesentlich geringer ausgeprägt (Fig. 6). Die IL-2-Antwort in Gegenwart von RT1D^l war bei niedrigeren MAS-Konzentrationen höher als bei HLA-DR1, nur bei der höchsten getesteten MAS-Konzentration konnte eine stärkere IL-2-Produktion in diesen Ansätzen nachgewiesen werden. Hingegen konnte sowohl bei nativen als auch RT1B^l-transfizierten L929-Zellen keine Reaktion des TZH festgestellt werden.

Die Präsentation von YPM durch RT1B^l und RT1D^l zeigte keine erheblichen intermolekularen Unterschiede. Humane MHC-Klasse-II-Moleküle erreichten schon bei sehr niedrigen Sag-Konzentrationen hohe IL-2-Antworten (höchste getestete Konzentration 0,08 µg/ml), die bei mehr als dem Doppelten der bei RT1B^l-/RT1D^l-Präsentation gemessenen Werte lagen. Bei bei-

den Ratten-MHC-Klasse-II-Molekülen stiegen die IL-2-Werte oberhalb der zweithöchsten YPM-Konzentration nicht mehr wesentlich an, die Präsenz nativer L929-Zellen bewirkte keine 53/4-Stimulation.

3.1.3.3 Reaktivität gegenüber gpMBP und L.casein

Zusätzlich zur Aktivierung durch Sag sollte die Reaktion der verwendeten TZH bei RT1B^l-oder RT1D^l-Präsentation ihres spezifischen Antigens untersucht werden. 53/4 und Klon19 entstanden durch die Fusion eines gpMBP- bzw. L.casein-spezifischen T-Zellklons mit BW58-Zellen und erkennen Peptidfragmente dieser Proteine RT1B^l-(53/4) bzw. RT1D^l-(Klon 19) restringiert.

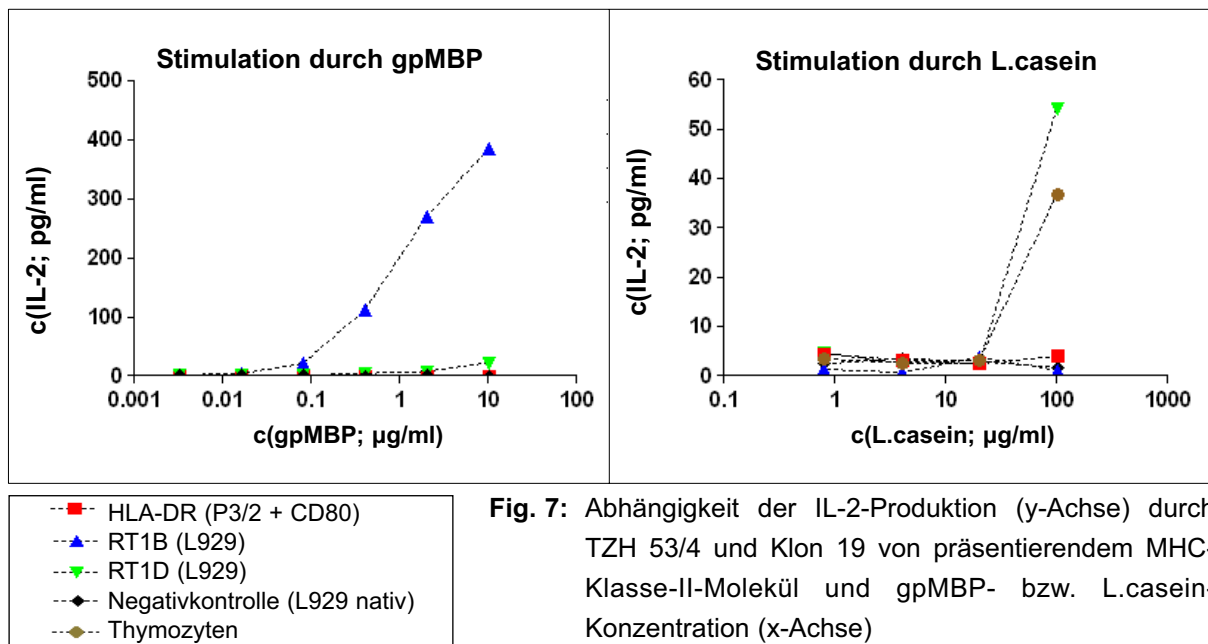


Fig. 7: Abhängigkeit der IL-2-Produktion (y-Achse) durch TZH 53/4 und Klon 19 von präsentierendem MHC-Klasse-II-Molekül und gpMBP- bzw. L.casein-Konzentration (x-Achse)

Wie Fig. 7 zeigt, waren RT1B^l-transfizierte L929-Zellen die einzigen Präsentatoren, die der 53/4-Zellreihe gpMBP derart präsentieren konnten, dass es zu einer starken IL-2-Freisetzung kam. Lediglich bei einer gpMBP-Konzentration von 10 µg/ml ließ sich auch bei RT1D^l-Präsentation eine TZH-Antwort feststellen, die allerdings nur etwa 5% der bei RT1B^l-Transfektanten beobachteten Menge erreichte. P3/2 + CD80-Zellen und untransfizierte L929-Zellen stimulierten nicht. L.casein wurde im Gegensatz zu gpMBP von RT1D^l-Zellen präsentiert. Obwohl eine IL-2-Produktion durch Klon 19 nur bei der höchsten verwendeten Konzentration (100 µg/ml) feststellbar war und bei weitem unter der 53/4-Antwort auf gpMBP lag, erreichte diese bei RT1D^l-transfizierten L929-Zellen um fast ein Drittel höhere Werte als in Gegenwart von APZ des Thymus, die als Positivkontrolle dienten.

Unter HLA-DR1- und RT1B^l-Anwesenheit ließ sich keine Aktivierung beobachten.

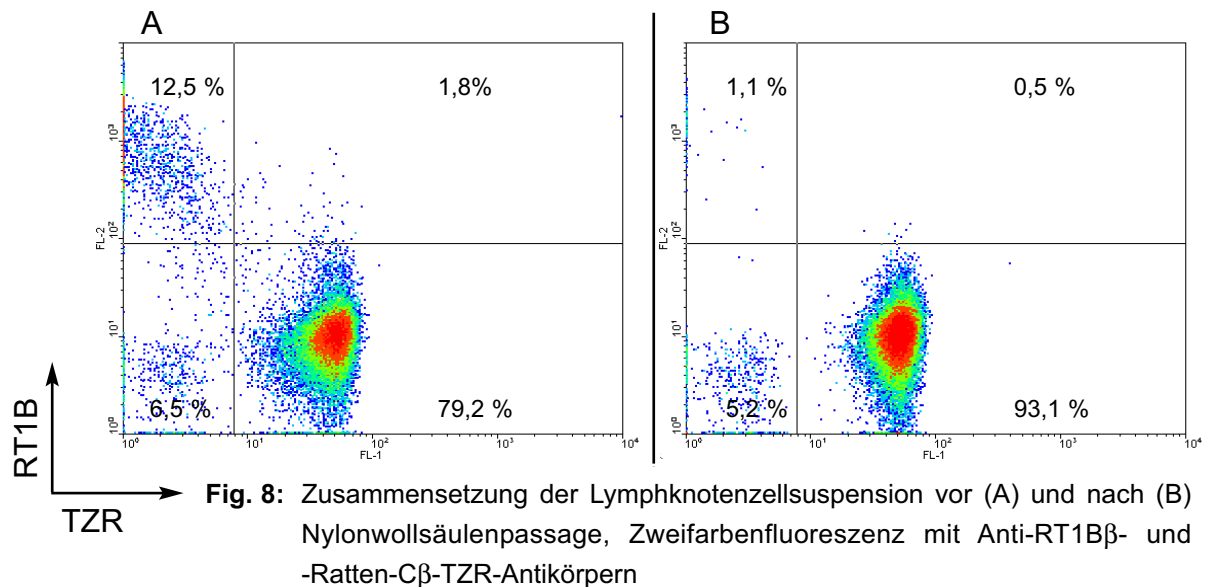
3.1.4 Veränderungen in der V β -Verteilung einer LEW-T-Zellpopulation unter Präsentation von SEC1, MAS und YPM durch LEW- und humane MHC-Klasse-II-Moleküle

Nach den Ergebnissen der Stimulation gereinigter T-Zellen durch DZ (s. 3.1.1), wurde das dort verwendete Protokoll zur Untersuchung der Präsentationsfunktion erstellter Transfektanten (s. 3.1.2) und der bereits erwähnten P3/2 + CD80-Zelllinie verwendet.

Eine genaue Beschreibung des Versuchsablaufs findet sich unter 2.3.8.1.

Da bei einer kombinierten Aufreinigung der T-Zellen die absolute Zellzahl stark reduziert wird, wurde auf ein Panning verzichtet und nur eine Nylonwollsäulenpassage durchgeführt.

Fig. 8 stellt die Zusammensetzung der Lymphknotenzellsuspension vor und nach Passage dar.



Obwohl kein Panning durchgeführt wurde, konnte durch eine langsamere Passage der Zellsuspension eine Reduktion des MHC-Klasse-II⁺-Anteils auf Werte ähnlich 3.1.1 erreicht werden. Ebenfalls analog zur Stimulation durch DZ wurden als Stimulationsmarker ein Sag-spezifischer Anstieg einer V β -Gruppe mit gleichzeitiger Verringerung nicht-reaktiver V β -Populationen und ein Anstieg des Blastenanteils gewählt, die angegebenen Werte beziehen sich im Gegensatz zu 3.1.1 aber in beiden Fällen auf C β ⁺-Zellen. Zusätzlich wurde die V β 16-Gruppe durch den mAK HIS42 in die Analyse miteinbezogen.

Die errechneten Werte in Abwesenheit eines Sag sind in Fig. 9 dargestellt.

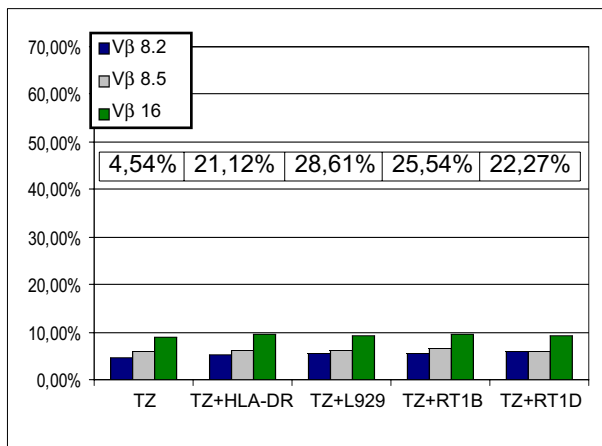


Fig. 9: Zusammensetzung der T-Zellpopulation ohne Sag. Das Diagramm zeigt den Anteil der jeweiligen V β -Population an der C β^+ -Zellgruppe (kleine Zellen) sowie den Blastenanteil in der C β^+ -Gruppe (Zahlenwerte). TZ = T-Zellen; HLA-DR, RT1B und RT1D = jeweiliges Präsentationsmolekül exprimierende Zelllinie

Alle Stimulationsansätze zeigten dieselbe V β -Verteilung. In Gegenwart präsentierender Zellen stieg der Anteil an Blasten in der C β -Gruppe gegenüber dem Nur-T-Zell-Ansatz an, was sich in ähnlichem Umfang ebenfalls in allen analysierten V β -Populationen beobachten ließ (nicht gezeigt).

Stimulation mit SEC1

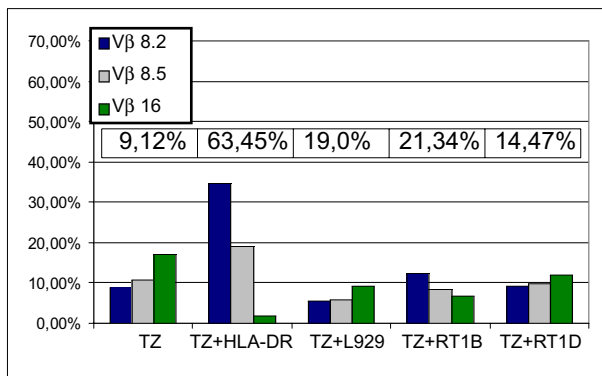


Fig. 10: Zusammensetzung der T-Zellpopulation nach Zugabe von SEC1 (2 μ g/ml). Das Diagramm zeigt den Anteil der jeweiligen V β -Gruppe an C β^+ -Zellen (Blasten) sowie den Blastenanteil in der C β^+ -Gruppe (Zahlenwerte). TZ = T-Zellen; HLA-DR, RT1B und RT1D = jeweiliges Präsentationsmolekül exprimierende Zelllinie

Die Zugabe von SEC1 (Fig. 10) bewirkte bei nativen und RT1D^L-transfizierten L929-Zellen nur geringe Unterschiede in der V β -Zusammensetzung, auch der prozentuale Blastenanteil blieb in diesen Ansätzen auf niedrigem Niveau. Die in der Negativkontrolle (Fig. 9) festgestellte Hierarchie der einzelnen Untergruppen blieb ebenfalls erhalten. In Gegenwart HLA-DR¹⁺-Zellen (P3/2 + CD80) kam es zu einer starken Erhöhung V β 8.2⁺- und in geringerem Maße auch V β 8.5⁺-Zellen bei gleichzeitiger Reduktion des V β 16-Anteils, wodurch sich die Reihenfolge der V β -Häufigkeit gegenüber Fig. 9 umkehrte. Ebenfalls ließ sich in der gesamten C β^+ -Zellpopulation ein ausgeprägter Anstieg des Blastenanteils beobachten.

Die für humane MHC-Klasse-II-Moleküle beschriebenen Veränderungen waren auch bei SEC1-Präsentation durch RT1B^L-Transfektanten zu beobachten. Auch hier kehrte sich die Hierarchie der V β -Verteilung um. Im Vergleich zur P3/2 + CD80-Stimulation waren die Veränderungen jedoch nur schwach ausgeprägt und dementsprechend gering der Blastenanteil unter C β^+ -Zellen. Die V β 8.2⁺-Gruppe, die unter den getesteten V β am stärksten stimuliert

wurde, zeigte jedoch einen deutlichen Unterschied im Blastenanteil gegenüber den nicht reaktiven Ansätzen (nicht gezeigt).

Stimulation mit MAS

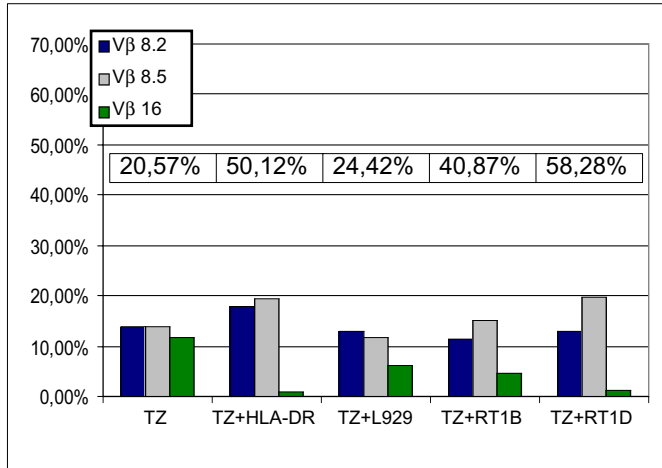


Fig. 11: Zusammensetzung der T-Zellpopulation nach Zugabe von MAS (5 ng/ml). Das Diagramm zeigt den Anteil der jeweiligen Vβ-Gruppe an Cβ⁺-Zellen (Blasten) sowie den Blastenanteil in der Cβ⁺-Gruppe (Zahlenwerte). TZ = T-Zellen; HLA-DR, RT1B und RT1D = jeweiliges Präsentationsmolekül exprimierende Zelllinie

Die Stimulation mit MAS (Fig. 11) führte im Vergleich mit SEC1 zu weniger ausgeprägten Veränderungen. Bereits ohne zusätzliche MHC-Klasse-II⁺-Zellen (Nur-T-Zellen, L929 nativ) kam es zu Veränderungen in der T-Zell-Vβ-Zusammensetzung mit einem Anstieg von Vβ8.2 und 8.5 gegenüber Fig. 9, der sich ebenfalls in einem Anstieg der Blasten im Nur-T-Zellansatz zeigte. Gegenüber den restlichen Ansätzen war jedoch die Reduktion Vβ16⁺-Zellen weniger stark ausgeprägt und der Anteil der Blasten an der Cβ⁺-Zellpopulation zwischen 15 und 35 % geringer.

Wurde MAS im Zusammenhang mit HLA-DR1⁺-Zellen oder den RT1D⁺-Transfektanten präsentiert, kam es neben dem beschriebenen Vβ8.2- und Vβ8.5-Anstieg zu einer ausgeprägten Verringerung der Vβ16⁺-Zellen. Der hohe Blastenanteil der Cβ⁺-Population zeigte eine ausgeprägte Proliferation an, wobei RT1D⁺-Transfektanten Werte knapp 10 % über denen der P3/2-Zelllinie erreichten.

Die Präsenz der RT1B⁺-Transfektanten führte sowohl in der Vβ-Verteilung als auch in den Blastenanteilen zu Ergebnissen zwischen denen nativer und RT1D⁺-L929-Zellen. Waren die Unterschiede in der Vβ-Zusammensetzung noch gering im Vergleich zu MHC-Klasse-II⁺-Ansätzen, stieg der Blastenanteil um 20 % in der Cβ⁺-Population, lag aber dennoch knapp 20 % unter dem der RT1D⁺-Transfektanten.

Stimulation mit YPM

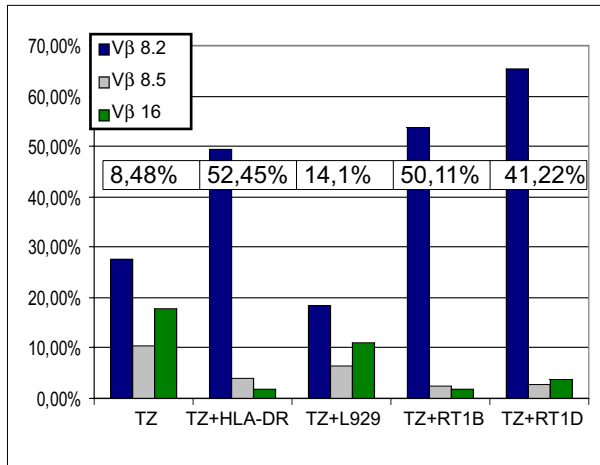


Fig. 12: Zusammensetzung der T-Zellpopulation nach Zugabe von YPM (2 µg/ml). Das Diagramm zeigt den Anteil der jeweiligen Vβ-Gruppe an Cβ⁺-Zellen (Blasten) sowie den Anteil an Blasten in der Cβ⁺-Gruppe (Zahlenwerte). TZ = T-Zellen, HLA-DR, RT1B und RT1D = jeweiliges Präsentationsmolekül exprimierende Zelllinie

Auch in der Stimulation mit YPM zeigten verbliebene APZ innerhalb der Lymphknotenzellen einen gewissen Beitrag zur T-Zell-Stimulation (Fig. 12). Sowohl im nur T-Zellen als auch im zusätzlich native L929-Zellen enthaltenden Ansatz stieg der Anteil Vβ8.2⁺-Zellen gegenüber Fig. 9 um bis zu 20 % an. Eine Reduktion der Vβ8.5- und 16-Gruppe, wie sie zumindest für Vβ8.5 aus 3.1.1 zu erwarten war, ließ sich jedoch nicht beobachten und auch der fehlende Anstieg des Blastenanteils innerhalb der Cβ⁺-Population spricht für eine schwache Aktivierung.

HLA-DR¹-, RT1B¹- und RT1D¹-Transfektanten führten im Unterschied dazu zu einem 20-40 % höheren Anteil der Vβ8.2⁺-Gruppe und einer ausgeprägten Verringerung Vβ8.5⁺- und Vβ16⁺-Zellen. War diese Veränderung am stärksten bei RT1D¹-L929-Zellen, so fand sich mit mehr als 50 % der höchste Blastenanteil in der Cβ⁺-Gruppe bei HLA-DR-Anwesenheit und lag etwa 10 % über dem bei RT1D¹- sowie knapp über dem bei RT1B¹-Präsentation.

3.2 Präsentation von vSag7 durch RT1B¹ und RT1D¹

3.2.1 Generierung vSag7-positiver Zelllinien

Neben der Präsentation bakterieller Sag durch RT1B¹ und RT1D¹ sollte als Beispiel für virale Sag die Stimulation durch das in der orf-Sequenz des endogenen Mausretrovirus mtv7 kodierte vSag7 untersucht werden. Dafür wurden die in 3.1.2 generierten L929-Zelllinien durch Kalziumphosphatpräzipitation mit dem dieses Gen enthaltenden pHβA-orf-Plasmid bzw. als Negativkontrolle mit pHβA-neo transfiziert (s. 2.2.11.1) und erfolgreich transformierte Zellen durch eine Plasmid-kodierte Geneticin-Resistenz selektioniert (s. 2.3.6).

Ein direkter Nachweis der orf-Sequenz in diesen Zelllinien erfolgte durch PCR (s. 2.2.8) unter Verwendung der unter 2.1.11 aufgelisteten mtv7-orf-forward- bzw. -reverse-Primer, wobei

zunächst mRNA der Zelllinien mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kits isoliert (s. 2.2.7) und in einer RT-PCR (s. 2.2.9) in cDNA umgeschrieben wurde.

Als Positivkontrolle wurden neben pH β A-orf 3A5-Zellen, die bereits das pH β A-orf enthielten, und mtv7⁺-LBB 3.4.16-Zellen benutzt.

Die in der PCR amplifizierte DNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.2.2), dessen Fotografie in Fig. 13 gezeigt ist.

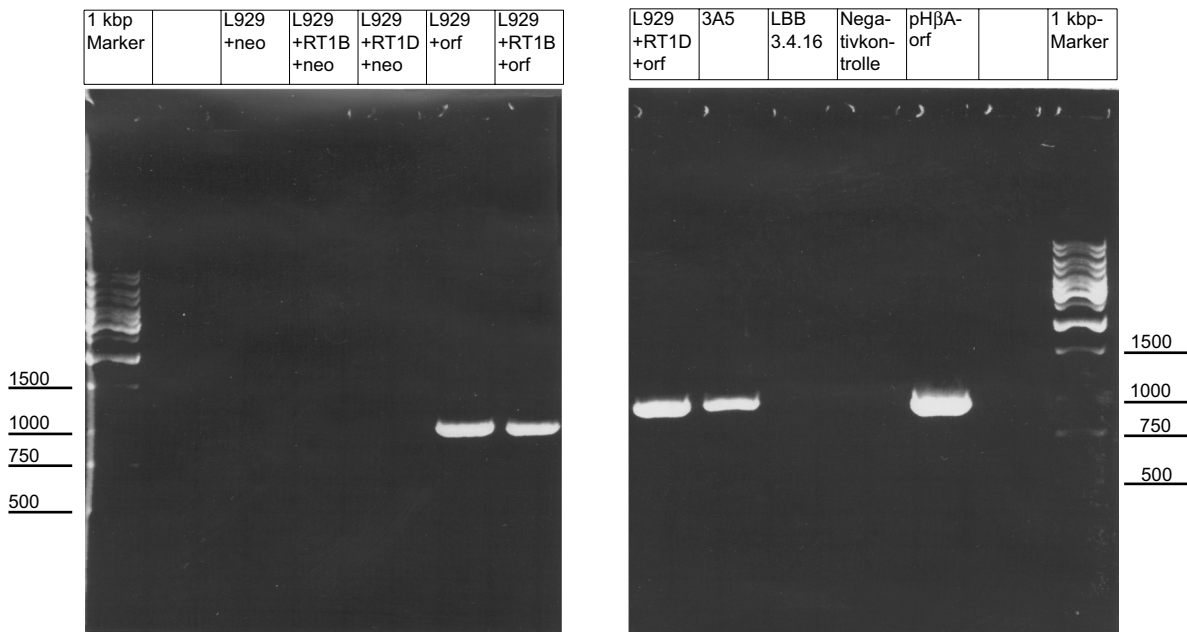


Fig. 13: Elektrophoretische Auftrennung der PCR von pH β A-orf- bzw. -neo-transfizierten L929-Zellen (nativ und RT1B-/RT1D-positiv), sowie 3A5- und LBB 3.4.16-Zellen in einem 1%-igen Agarosegel, zusätzlich pH β A-orf als Positiv- und Aqua dest. als Negativkontrolle. Zum Größenvergleich wurde ein 1kbp-Marker verwendet. neo/orf = entsprechendes Plasmid

Der Erfolg der Transfektion zeigte sich bei den Zelllinien, denen pH β A-orf übertragen worden war, in einer Bande bei etwa 1000 bp entsprechend der Länge der bekannten Sequenz. 3A5-Zellen reagierten ebenfalls positiv, während bei Zellen, die pH β A-neo erhielten, kein PCR-Produkt nachgewiesen werden konnte. Unerwartet war allerdings das Fehlen der Bande bei mtv7⁺-LBB 3.4.16-Zellen (s. 4.4).

Die erstellten Zelllinien wurden ähnlich bakteriellen Sag auf ihre Präsentationsfunktion in einer Hybridom- und einer T-Zellstimulation getestet.

3.2.2 Das TZH RG17 erkennt vSag7 nicht im Zusammenhang mit LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen

Nachdem der Erfolg der Transfektion unter 3.2.1 überprüft worden war, wurden die pH β A-neo/orf-transfizierten Zelllinien in einem unter 2.3.9.2 beschriebenen Versuch als Stimulatoren

für das vSag7-reaktive TZH RG17 verwendet (Subramanyam *et al.*, 1993).

Als Positivkontrolle wurden 3A5- und LBB 3.4.16-Zellen als Stimulatoren verwendet. Nach Inkubation wurden die Überstände gereinigt und mittels ELISA auf ihren IL-2-Gehalt untersucht, analog zu 3.1.3 diente ein Ansatz mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle.

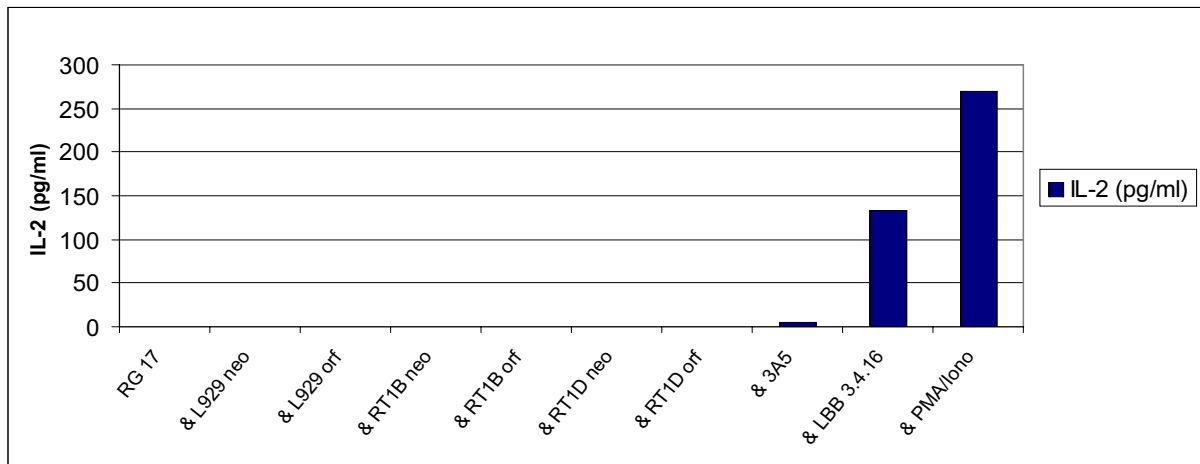


Fig. 14: IL-2-Produktion (in pg/ml) durch RG17 in Gegenwart der angegebenen Zelllinien. RG17 = Hybridom alleine als Negativkontrolle, PMA/Iono = RG17 + PMA/Ionomycin, RT1B und RT1D = jeweiliges Präsentationsmolekül exprimierende L929-Zellen, neo/orf = pH β A-neo/orf transfizierte L929-Zellen

Keine der vSag7-Gen⁺-L929-Zelllinien konnte eine TZH-Antwort auslösen, unabhängig davon, ob diese mit Ratten-MHC-Klasse-II-Molekülen transfiziert worden waren oder nicht. 3A5-Zellen mit HLA-DR1 als Präsentationsmolekül bewirkten eine sehr geringe IL-2-Produktion, hingegen konnte in Gegenwart von H2-A/E (LBB 3.4.16) eine Stimulation von RG17 beobachtet werden, wobei die IL-2-Werte knapp 50 % der bei PMA/Ionomycin-Zugabe gemessenen Werte erreichten.

3.2.3 Stimulation von Lymphknotenzellen durch vSag7-positive Zelllinien

3.2.3.1 LEW-Lymphozyten werden durch Kokultur mit vSag7-exprimierenden Zellen aktiviert

In einer zweiten Präsentationsanalyse wurden die in der RG17-Stimulation getesteten Zelllinien als Aktivatoren für ungereinigte LEW-Lymphknotenzellen eingesetzt.

Eine genaue Angabe des Versuchsprotokolls findet sich unter 2.3.8.2, in der Auswertung wurde derselbe Weg zur Berechnung der Stimulationsmarker gewählt wie in der Stimulation durch DZ (s. 3.1.1), zusätzlich wurde wie in 3.1.4 auch die V β 16-Gruppe analysiert.

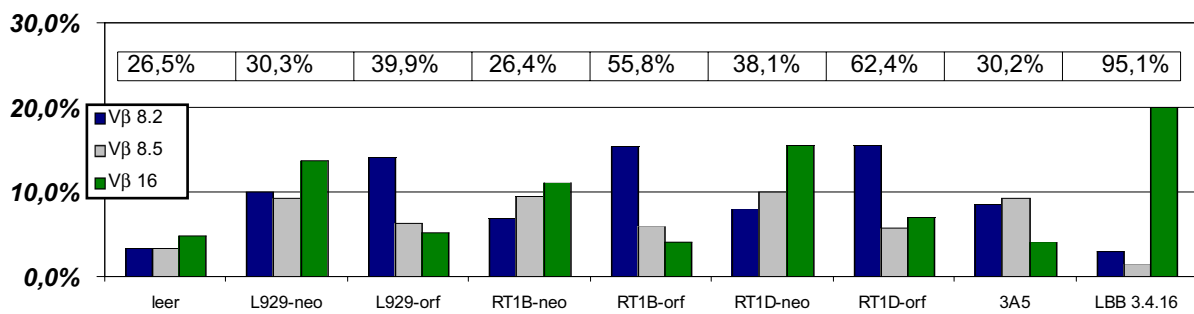


Fig. 15: T-Zell-Zusammensetzung nach 5-tägiger Inkubation mit Präsentatoren. Anteil einer Vβ-Gruppe an CD4⁺-Zellen. Zusätzlich Angabe des Blastenanteils in Cβ⁺CD4⁺-Population (Zahlenwerte). "Leer" = Lymphknotenzellen ohne Präsentatoren, ansonsten Angabe der zugegebenen Zelllinie (L929 = native L-Zellen, RT1B/RT1D = LEW-MHC-Klasse-II-transfizierte L-Zellen, neo/orf = mit jeweiligem Plasmid transfizierte L-Zellen)

Wie aus Fig. 15 ersichtlich, zeigte die CD4⁺-Population ohne Stimulatoren und in Anwesenheit von pHβA-neo-transfizierten L929-Zelllinien trotz Unterschieden in den absoluten Werten die gleiche Hierarchie in der Vβ-Häufigkeitsverteilung. So stellten Vβ16⁺-Zellen die größte hier untersuchte Gruppe, während Vβ8.2 und 8.5 in etwa gleich, bzw. Vβ8.5⁺-Zellen etwas häufiger waren.

Die Ursache für die um bis zu 10 % erhöhten absoluten Werte ist unklar, allerdings ist eine Sagspezifische Proliferation sehr unwahrscheinlich, da sich alle untersuchten Vβ-Gruppen gleichsinnig verhalten.

Bei allen drei vSag7-transfizierten L-Zellen, auch den MHC-Klasse-II-negativen, ließ sich eine Umkehr der Häufigkeitsverteilung feststellen. Die ursprünglich kleinste der getesteten Gruppen, Vβ8.2, stellte nach der Inkubation mit knapp 15 % den größten Anteil. Vβ16 war bis auf den Ansatz mit RT1D^L- und vSag7-transfizierten-Zellen mit ca. 5 % die kleinste Gruppe und lag damit noch 1-2 % unter Vβ8.5.

Besonders bei RT1B^L- und RT1D^L-L-Zellen war der Anteil an Blasten in der gesamten CD4⁺-Population gegenüber vSag7⁻-Ansätzen erhöht (etwa 20 %) und unterschied sich damit auch von MHC-Klasse-II⁻, orf⁺-Zellen, bei denen dieser Wert nur leicht anstieg.

Unerwartet schwach waren die Veränderungen mit 3A5-Zellen als Präsentatoren. In der Vβ-Verteilung ließ sich eine Vβ8.2- und 8.5-Proliferation gegenüber Vβ16 beobachten, allerdings war der Blastenanteil in CD4⁺-Zellen nicht von nicht-stimulatorischen Ansätzen zu unterscheiden.

Die LBB 3.4.16-Zelllinie führte gegenüber den 3A5-Zellen nicht nur zu einer starken Stimulation von Vβ8.2 und 8.5 mit Blastenanteilen von über 90 % (nicht gezeigt), vielmehr kam es zusätzlich zu einer starken Stimulation von Vβ16, die so ausgeprägt war, dass trotz der Proliferation der anderen Vβ diese Gruppe in ihrer Häufigkeit auf etwa 20 % anstieg, während Vβ8.2 im Vergleich zum Leeransatz ohne Präsentatoren gleich blieb und Vβ8.5 sogar in der Häufigkeit abnahm.

3.2.3.2 Das TZh RG17 wird durch eine Kombination aus H2-A/E exprimierenden Zelllinien und L929-vSag7-Transfektanten aktiviert

Da unerwarteterweise auch in Gegenwart Nicht-RT1B^l- oder -RT1D^l-transfizierter L929-Zellen bei Vorhandensein des vSag7-Gens eine Stimulation zu beobachten war, wurde der Versuch zunächst mit durch Nylonwollsäule (s. 2.3.13.1) gereinigten Lymphknotenzellen wiederholt, um eventuelle Auswirkungen der in Lymphknoten enthaltenen MHC-Klasse-II⁺-Population beurteilen zu können.

In der Auswertung zeigte sich, dass nach der Aufreinigung die Gesamtstimulation wesentlich geringer ausfiel und sowohl zwischen neo- und orf-, als auch innerhalb der orf-transfizierten L-Zellen nur noch geringe Unterschiede bestanden, wobei die Veränderungen in Gegenwart RT1B^l-Transfektanten noch am ausgeprägtesten waren (nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen ließen, aufgrund der gezeigten Stimulation in Gegenwart MHC-Klasse-II⁻, aber vSag7⁺-L929-Zellen und den geschilderten Auswirkungen einer T-Zellanreicherung, den Schluss auf eine Interaktion zwischen orf-Transfektanten und zur Präsentation befähigten Zellen der Lymphknotenpopulation zu.

Um dies zu testen, wurde zunächst eine RG17-Stimulation durchgeführt. Entsprechend 2.3.9.2 wurden jeweils LBB IIV11-Zellen, eine mtv7-Deletionsvariante der LBB 3.4.16-Zelllinie, sowie LPS-stimulierte (s. 2.3.8.4) und Ficoll-gereinigte (s. 2.3.7) LEW- bzw. BALB/c-Milzzellen mit dem TZh und den MHC-Klasse-II⁻, neo- oder orf-transfizierten L929-Zellen 48 h inkubiert und anschließend die Kulturüberstände mittels ELISA (s. 2.3.10) auf ihren IL-2-Gehalt untersucht.

In Gegenwart von BALB/c-Zellen konnte bereits im Zusammenhang mit L929-neo-Transfektanten eine TZh-Stimulation nachgewiesen werden, während dieses bei LBB IIV11- und LEW-Zellen nicht zu beobachten war (Fig. 16). Waren vSag7⁺-Zellen anwesend, stieg die IL-2-Synthese im Ansatz mit BALB/c-Zellen auf mehr als das Doppelte und auch die Anwesenheit von LBB IIV11-Zellen führte zu einer nachweisbaren TZh-Reaktion, während diese bei den LEW-Milzzellen ausblieb.

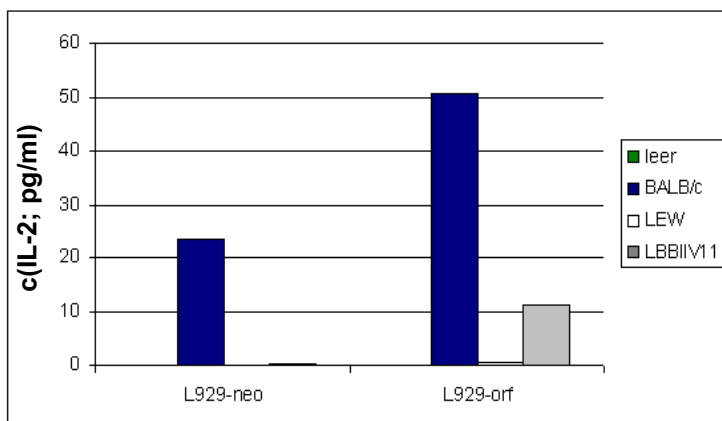
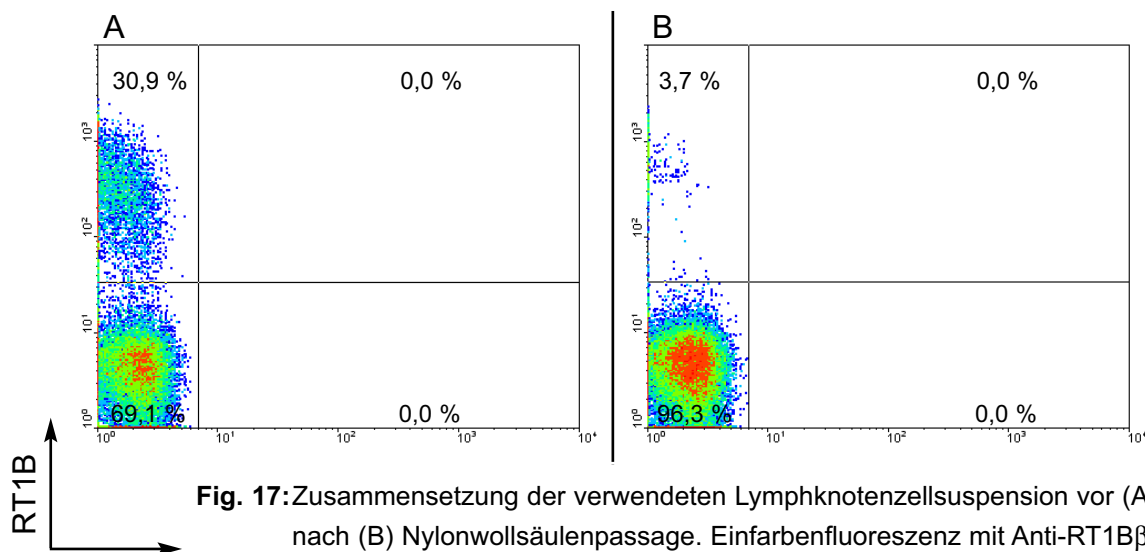


Fig. 16: Gemessene IL-2-Werte in Gegenwart der angegebenen Zelllinien und -populationen, "leer" = RG17-Hybridom als Negativkontrolle, BALB/c und LEW = LPS- und Ficoll-behandelte Milzzellen aus BALB/c-Mäusen bzw. LEW-Ratten, neo/orf = mit jeweiligem Plasmid transfizierte L-Zellen

Diese Ergebnisse wiesen auf eine vSag7-bedingte Stimulation im Zusammenhang mit Maus-Klasse-II-Molekülen (BALB/c und LBBIIV11) und damit auf eine Interaktion der anwesenden Zelllinien hin. Da dies aufgrund vorangegangener Versuche auch für die Transfektanten und RT1B^l/RT1D^l-Lymphknotenzellen zu bestehen schien, wurde anschließend an diesen Versuch eine polyklonale Stimulation durchgeführt. Im Gegensatz zu 3.2.3.1 wurden auch hier nur die MHC-Klasse-II⁻-L929-Transfektanten und durch Nylonwollsäulenpassage (s. 2.3.13.1) gereinigte Lymphknotenzellen als Testpopulation eingesetzt. Fig. 17 zeigt die Zusammensetzung der Lymphknotenzellen vor und nach T-Zellanreicherung in Bezug auf MHC-Klasse-II-Moleküle.



Vor der Aufreinigung ließen sich etwa 30 % RT1B^l-Zellen nachweisen, deren Anteil sich durch die Aufreinigung auf etwas weniger als 4 % verringerte.

3.2.3.3 LEW-T-Lymphozyten proliferieren ausgeprägt in Gegenwart vSag7⁺-MHC-Klasse-II-Transfektanten bei Kombination mit Maus- oder Ratten-Klasse-II⁺-Zelllinien

In der Stimulation (entsprechend 2.3.8.2) wurden verschiedene Kombinationen getestet, die neben den aufgereinigten Lymphknotenzellen entweder L929-neo- bzw. -orf-Zellen alleine oder zusätzlich LBB IIV11 oder LPS-stimulierte LEW-Milzzellen enthielten. Ebenfalls wurden LBB 3.4.16 und LBB IIV11 sowie 3A5 als alleinige Stimulatoren eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte analog 3.1.1, bezog allerdings zusätzlich die V β 13- und V β 16-Gruppe mit ein.

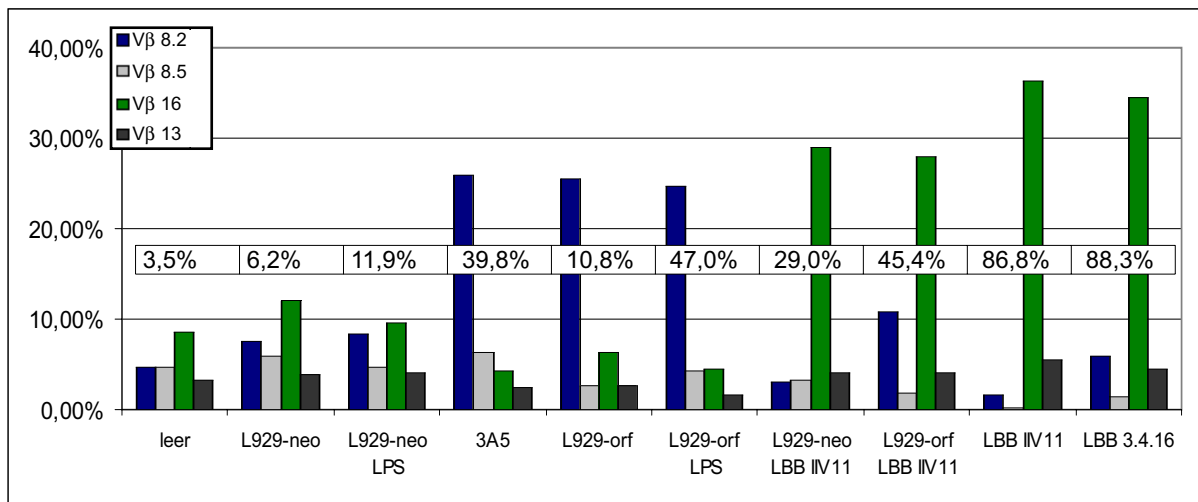


Fig. 18: T-Zell-Vβ-Zusammensetzung nach 5-tägiger Inkubation mit angegebenen Zelllinien. Anteil einer Vβ-Gruppe an CD4⁺-Zellen sowie Blastenanteil der Cβ⁺CD4⁺-Zellen (Zahlenwerte) "Leer" = Lymphknotenzellen ohne Präsentatoren, ansonsten Angabe der zugegebenen Zelllinie (L929-neo/orf = native L-Zellen mit jeweiligem Plasmid transformiert, LPS = LPS- und Ficoll-behandelte LEW-Milzzellen)

Die in Fig. 18 dargestellten Ergebnisse zeigen in den Sag-freien Ansätzen eine einheitliche Vβ-Verteilung, in der Vβ13⁺-Zellen mit ca. 3,5 % die kleinste und Vβ16⁺-Zellen mit 8-12% die größte Zellpopulation stellten, während die Vβ8.2- und 8.5-Gruppen in der Häufigkeit zwischen diesen Werten lagen. Der Blastenanteil war insgesamt gering ausgeprägt. Die Stimulation mit vSag7 bei HLA-DR-Präsentation (3A5-Zellen) führte zu einem Anstieg der Vβ8.2⁺-Gruppe auf über 25 % bei gleich bleibenden Werten für die Vβ8.5⁺-Zellen und einem Rückgang der Vβ13- und 16-Population. Ebenfalls vergrößerte sich der Blastenanteil auf knapp 40 %. Waren an Stelle von 3A5-Zellen vSag7⁺-L929-Zellen vorhanden, kam es ebenfalls zu ähnlich stark ausgeprägten Veränderungen in der Vβ-Verteilung, die zusätzlich mit einer Zunahme des Blastenanteils von etwa 10 % auf über 45 % in CD4⁺Cβ⁺-Zellen und von 37 auf etwa 86 % in Vβ8.2⁺-Zellen einhergingen (nicht gezeigt), wenn LPS-behandelte Zellen hinzugegeben wurden.

LBB 3.4.16-Zellen aktivierten wie bereits unter 3.2.3.1 dargestellt vor allem Vβ16⁺-T-Zellen, sowie Vβ.8.2 in geringerem Umfang bei insgesamt sehr starker Gesamtstimulation (Blastenanteil fast 90 %). Die hier zusätzlich analysierte Vβ13-Gruppe blieb in ihrer Häufigkeit ähnlich Vβ8.2 in etwa gleich, was bei Betrachtung der starken Gesamtproliferation ebenfalls für eine mittlere Reaktivität spricht.

Die vSag7⁺-LBB IIV11-Zelllinie aktivierte ebenfalls Vβ16 und 13, während jedoch Vβ8.2⁺- und 8.5⁺-Zellen in ihrer Häufigkeit stark zurückgingen. Dies ließ sich ebenfalls im gemischten Ansatz aus L929-neo- und LBB IIV11-Zellen beobachten, in dem allerdings die Gesamtstimulation, erkennbar am Blastenanteil, wesentlich geringer und auch die Abnahme vSag7-areaktiver Vβ-Gruppen nicht gleich stark ausgeprägt war.

Kombinierte man jedoch LBB IIV11- mit L929-orf-Zellen, so zeigte sich einerseits eine star-

ke Zunahme $V\beta 16^+$ -Zellen, andererseits auch der $V\beta 8.2^+$ -Gruppe, die von LBB IIV11 alleine nicht stimuliert wurde. Die Veränderungen entsprechen denen der LBB 3.4.16-Stimulation, wobei der hier beobachtete $V\beta 8.2$ -Anstieg noch ausgeprägter war. Zusätzlich ließ sich im Vergleich zum gemischten Ansatz aus L929-neo- und LBB IIV11-Zellen eine starke Erhöhung des Blastenanteils von knapp 30 auf über 45 % feststellen.

3.2.3.4 Die Injektion vSag7-transfizierter Zellen führt in vivo zu einer Expansion reaktiver $V\beta$ -Gruppen in der LEW-Ratte

Um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen, wurden jeweils MHC-Klasse-II⁻-L929-neo- bzw. -L929-orf-Zellen auf ihre Stimulationsfähigkeit in vivo getestet.

Nach Durchführung entsprechend 2.3.14 wurden die erstellten Zellsuspensionen auf ihre $V\beta$ -Zusammensetzung und den Blastenanteil in $CD4^+C\beta^+$ -Zellen getestet. Zusätzlich dienten die drainierenden poplitealen Lymphknoten auf der nicht injizierten Seite als Kontrolle.

Wie in Fig. 19 dargestellt (s. nächste Seite), zeigten die Lymphknoten beider Seiten bei L929-neo- und auf der Kontrollseite bei L929-orf-Applikation vergleichbare $V\beta$ -Anteile. Wie in 3.2.3.3 stellten $V\beta 16^+$ -Zellen die größte und $V\beta 13^+$ -Zellen die kleinste Population bei mittleren Werten für $V\beta 8.2$ und 8.5. Auf der L929-orf-Applikationsseite hingegen dominierten $V\beta 8.2$ mit fast 15%, verbunden mit einer Zunahme der $V\beta 8.5^+$ -Zellen auf Werte ähnlich $V\beta 16$. Ein Anstieg des Blastenanteils im Vergleich zwischen L929-neo- und -orf-Applikation war ebenfalls zu beobachten, allerdings nur relativ schwach ausgeprägt.

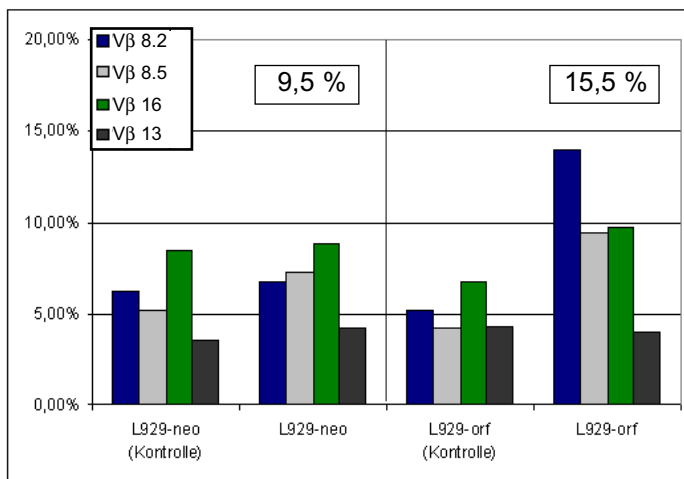


Fig. 19: T-Zell- $V\beta$ -Zusammensetzung in drainierenden Lymphknoten, vier Tage nach Applikation angegebener Zelllinien. Anteil einer $V\beta$ -Gruppe an $CD4^+$ -Zellen sowie des Blastenanteils in $C\beta^+CD4^+$ -Zellen (Zahlenwerte)
L929-neo/orf = native L-Zellen mit jeweiligem Plasmid transfiziert, Kontrolle = Lymphknoten der Applikationsgegensite

3.3 Expression gemischter LEW-MHC-Klasse-II-Isotypen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Erstellung gemischter Isotypen aus RT1B^I- und RT1D^I-Einzelketten untersucht. Ziel war es zunächst, diese Moleküle zu generieren und anschließend bei Nachweis einer Oberflächenexpression auf ihre Funktionalität zu prüfen. Da sich diese Proteine wie später gezeigt nicht auf den Transfektanten detektieren ließen, wurden Zelllinien zusätzlich mit der invarianten Kette (Ii) der Maus transfiziert, um eine Expression zu erleichtern. Da aber auch nach Ii-Übertragung keine gemischten Isotypen nachzuweisen waren, wurden ein Western Blot und eine Durchflusszytometrie nach intrazellulärer Färbung durchgeführt, um Hinweise auf mögliche Ursachen der fehlenden Expression zu finden.

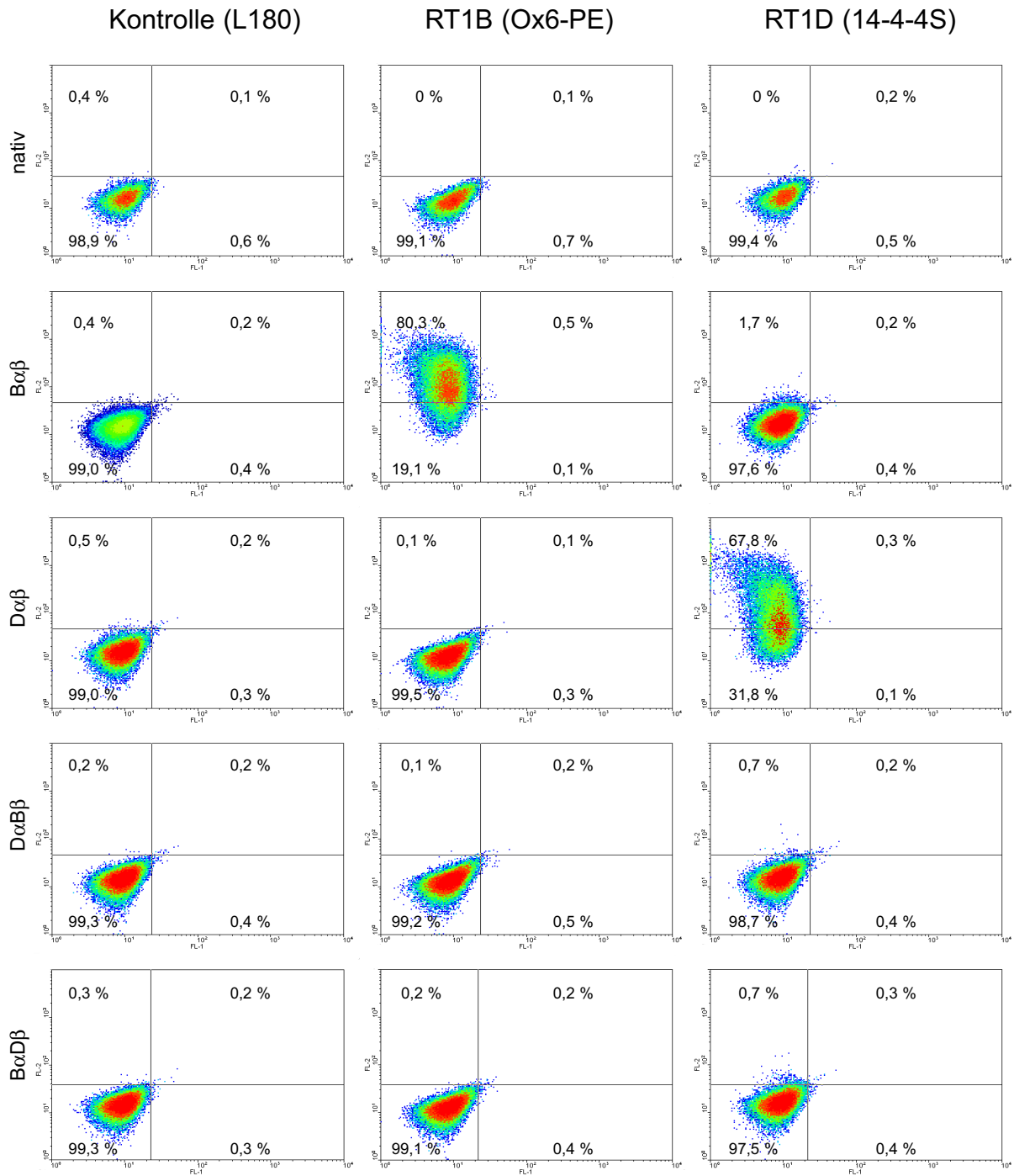
In der Versuchsdurchführung wurden die jeweiligen Zelllinien durch retroviralen Gentransfer (s. 2.2.11.2) mit der physiologischen oder isotypisch gemischten Kettengenkonfiguration transfiziert. Der normale Ansatz diente dabei zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und als Referenzwert für eine mögliche Expression gemischter Isotypen.

Die Oberflächenexpression wurde im Anschluss durch Durchflusszytometrie mit Hilfe mAK gegen RT1B^I (Ox6) und RT1D^I (14-4-4S) geprüft. Eine Detektion der gemischten Ansätze konnte allerdings aufgrund der Spezifität von Ox6 für die RT1B^Iβ-Kette und 14-4-4S für die α-Kette des RT1D^I nur in der Kombination RT1D^IαB^Iβ erwartet werden.

3.3.1 P80-Zellen exprimieren nach Transfektion keine gemischten Isotypen auf ihrer Oberfläche

In einem ersten Versuch wurden nach dem unter 3.3 beschriebenen Schema P80-Zellen mit LEW-MHC-Klasse-II-Kettengen transfiziert. Die Ergebnisse der in der FACS-Analyse bestimmten Expression sind in Fig. 20 gezeigt. In den normal konfigurierten Ansätzen zeigte sich eine durchweg hohe Transfektionsrate mit ca. 80 % RT1B^I-Zellen und knapp 70 % bei RT1D^I-Transfektanten. Wahrscheinlich wurden jedoch fast 100 % der Zellen erfolgreich transfiziert, da in der Dichtedarstellung keine negative Population erkennbar war.

In den Ansätzen RT1B^IαD^Iβ und RT1D^IαB^Iβ konnte weder mit dem mAK Ox6 noch mit 14-4-4S das Vorliegen eines gemischten Isotyps nachgewiesen werden.



RT1B/RT1D

Fig. 20: FACS-Analyse von LEW-MHC-Klasse-II-Kettengen-transfizierten P80-Zellen. Verwendeter AK oben, Kettenkombination links (nativ = untransfiziert). Färbung auf Ratten-MHC-Klasse-II-Moleküle

3.3.2 Transfektion von P80- und L929-Zellen mit der invarianten Kette der Maus

Eine mögliche Ursache für das in 3.3.1 beobachtete Fehlen der Expression gemischter Isotypen konnte die zu geringe Expression der invarianten Kette in den transfizierten P80-Zellen sein. Während Ii für die Oberflächenexpression isotypisch korrekter MHC-Klasse II-Moleküle nicht essentiell ist, die Expressionsrate allerdings in gewissem Umfang steigern kann, ist zumindest für haplotypisch gemischte Isotypen eine Verstärkung der Expression um bis zu Faktor 18 beschrieben (*Layet et al., 1991*). Basierend auf diesen Hinweisen wurden native P80- und L929-Zellen zunächst mit Maus-Ii und anschließend entsprechend dem Schema in 3.3.1 mit MHC-Klasse II-Kettengenkombinationen transfiziert.

Das Gen der invarianten Kette lag ursprünglich in einem für die verwendete Transfektionsmethode schlecht geeigneten Vektor (pcx-3mIi) vor und wurde daher vor Verwendung in pczCFG-IEGZ umklontiert. Dafür wurde das Insert in einem Restriktionsverdau mit EcoRI herausgeschnitten (s. 2.2.1) und nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1%-igem Agarosegel (s. 2.2.2) aus diesem eluiert (s. 2.2.3). Da der gewünschte Vektor pczCFG-IEGZ bereits linearisiert und in dephosphorylierter Form vorlag, konnte er direkt in der Ligation eingesetzt werden (s. 2.2.6.3). Neben pczCFG-IEGZ wurde auch eine Ligation mit pczCFG-IZ durchgeführt, der vor der Ligation noch aufbereitet werden musste (s. 2.2.6.1). Die Ergebnisse sind allerdings, da nachfolgend nur pczCFG-IEGZ verwendet wurde, nicht gezeigt. Im Weiteren wurden kompetente Top 10 F⁻-Bakterien mit dem neu generierten Plasmid transformiert und je 100 µl auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten (s. 2.2.4) aufgebracht. Über Nacht wuchsen Einzelkolonien Plasmid-transformierter Bakterien heran, aus denen 13 ausgewählt wurden. Da das Wachsen auf Selektionsmedium zwar die Anwesenheit des für die Ampicillin-Resistenz kodierenden Vektors anzeigt, allerdings keine Aussage über Vorhandensein und Orientierung des Inserts nach Ligation trifft, wurde jeweils eine Vorkultur der 13 Einzelkolonien angelegt und eine analytische Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt (s. 2.2.5.3). Die gewonnene DNA wurde in einem Restriktionsverdau mit SacI gespalten und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Da von den insgesamt drei SacI-Schnittstellen eine innerhalb des Inserts lag, konnte aus Anzahl und Größe der Fragmente des Verdau eine Aussage über den Erfolg der Klonierung gemacht werden.

Fig. 21 zeigt die Ergebnisse des Verdau der 13 Einzelkolonien. Bei korrekter Ligation wurden drei Fragmente in einer Länge von etwa 5000, 1600 und 3200 Basenpaaren erwartet, was nur für die beiden Klone 1 und 10 zutrifft (grün markiert). Klon 7 ist ein Beispiel für eine umgekehrte Insertorientierung, bei der zwar das etwa 5000 bp große Fragment vorliegt, die beiden anderen jedoch mit ca. 2400 Basenpaaren fast dieselbe Größe aufweisen.

Klon 1 und 10 wurden für die weitere Verwendung ausgewählt und eine Sequenzierung durchgeführt (s. 2.2.10), die die korrekte Ligation bestätigte (Ergebnis nicht gezeigt).

Im Anschluss wurde eine Großpräparation der Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Maxi Kits durchgeführt (s. 2.2.5.2) und die gewonnene DNA für die folgenden Transfektionen eingesetzt.

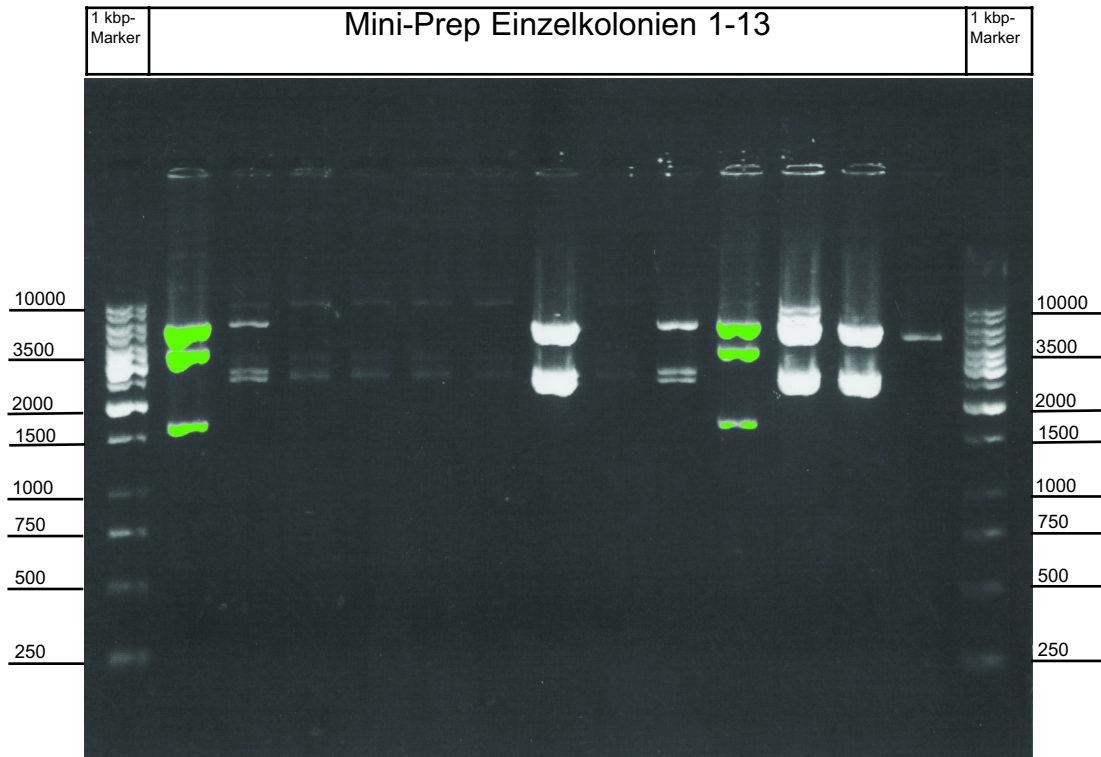


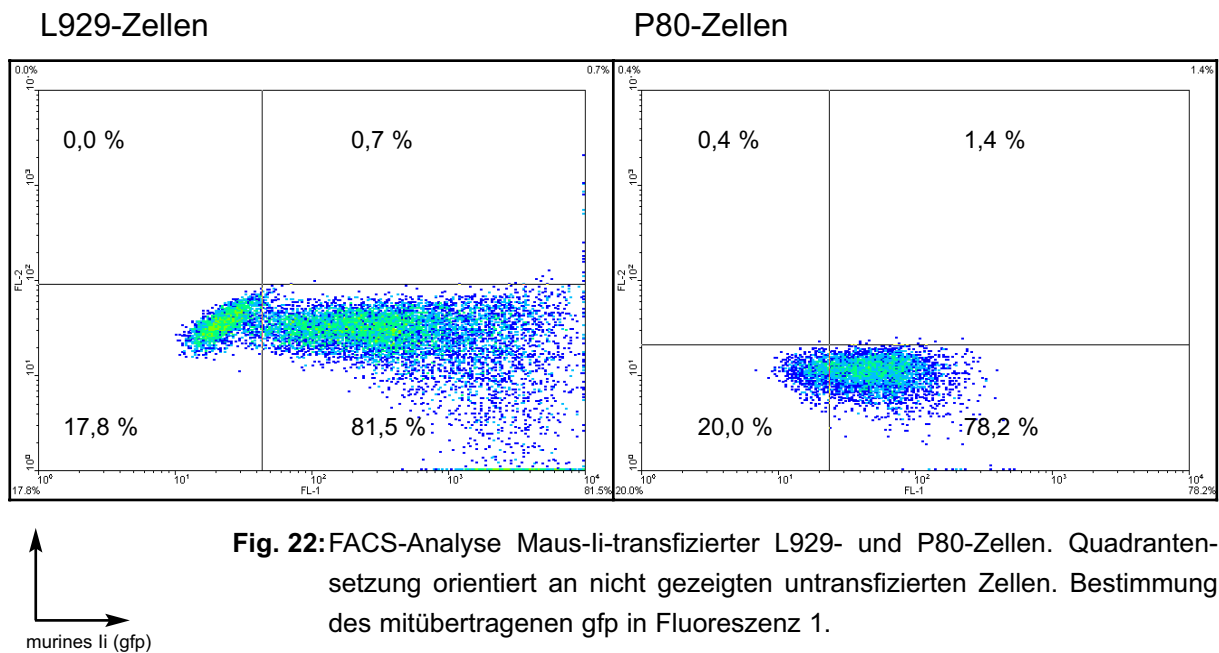
Fig. 21: Restriktionsverdau-Gelelektrophorese der Plasmid-DNA von 13 Einzelkolonien nach Transformation mit Maus-Ii in pczCFG-IEGZ. Restriktionsenzym Sac I, verwendeter Marker 1 kbp. Ansätze mit erwarteten Fragmentlängen grün gefärbt.

Durch retroviralen Gentransfer wurden die in 3.3.1 verwendeten P80-Zellen und zusätzlich auch native L929-Zellen mit dem neu generierten Vektor transfiziert (s. 2.2.11.2). Das im Vektor ebenfalls kodierte gfp diente in der Durchflusszytometrie als Indikator für das Ii-Vorliegen in den Transfektanten. Fig. 22 (s. nächste Seite) zeigt die FACS-Analyse der erstellten Transfektanten, in der in beiden Zelllinien jeweils etwa 80 % der Zellen positiv für gfp waren.

Allerdings zeigte sich im weiteren Verlauf, dass P80-Zellen, angezeigt durch einen Intensitätsverlust der assoziierten Fluoreszenz, zunehmend das Ii-Gen zu verlieren schienen (s. Fig. 23). Eine Unterscheidung zwischen Ii- und nicht-transfizierten Zellen blieb aber dennoch möglich.

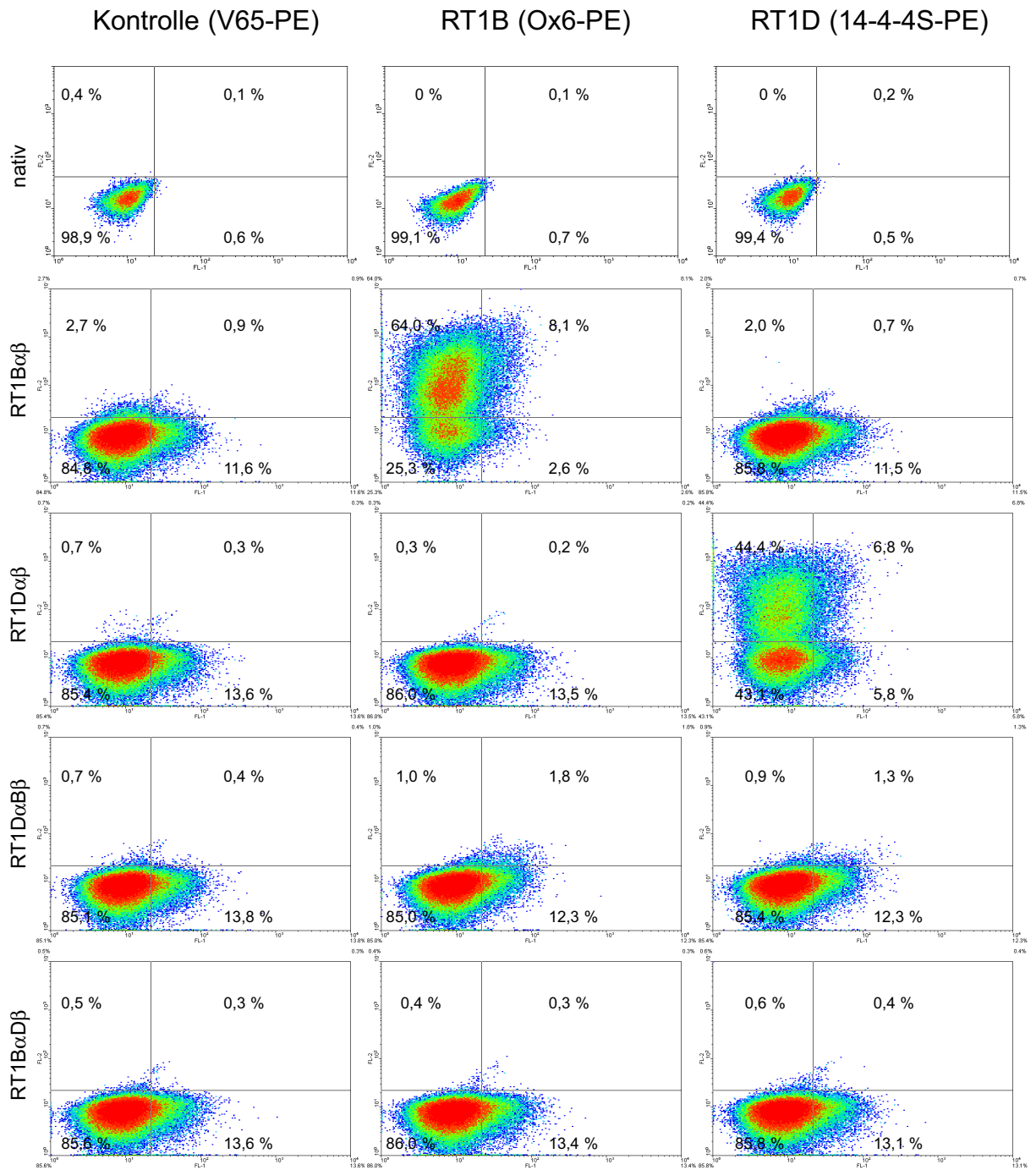
3.3.3 Unter Kotransfektion mit Maus-Ii steigt die Expression regulärer LEW-MHC-II-Moleküle, gemischte Isotypen sind jedoch nicht eindeutig auf der Zelloberfläche nachweisbar

Die in 3.3.2 erstellten Ii-positiven L929- und P80-Zellen wurden entsprechend dem Schema in 3.3.1 erneut mit Ratten-MHC-Klasse-II-Kettengenkombinationen durch retroviralen Gentransfer (s. 2.2.11.2) modifiziert.



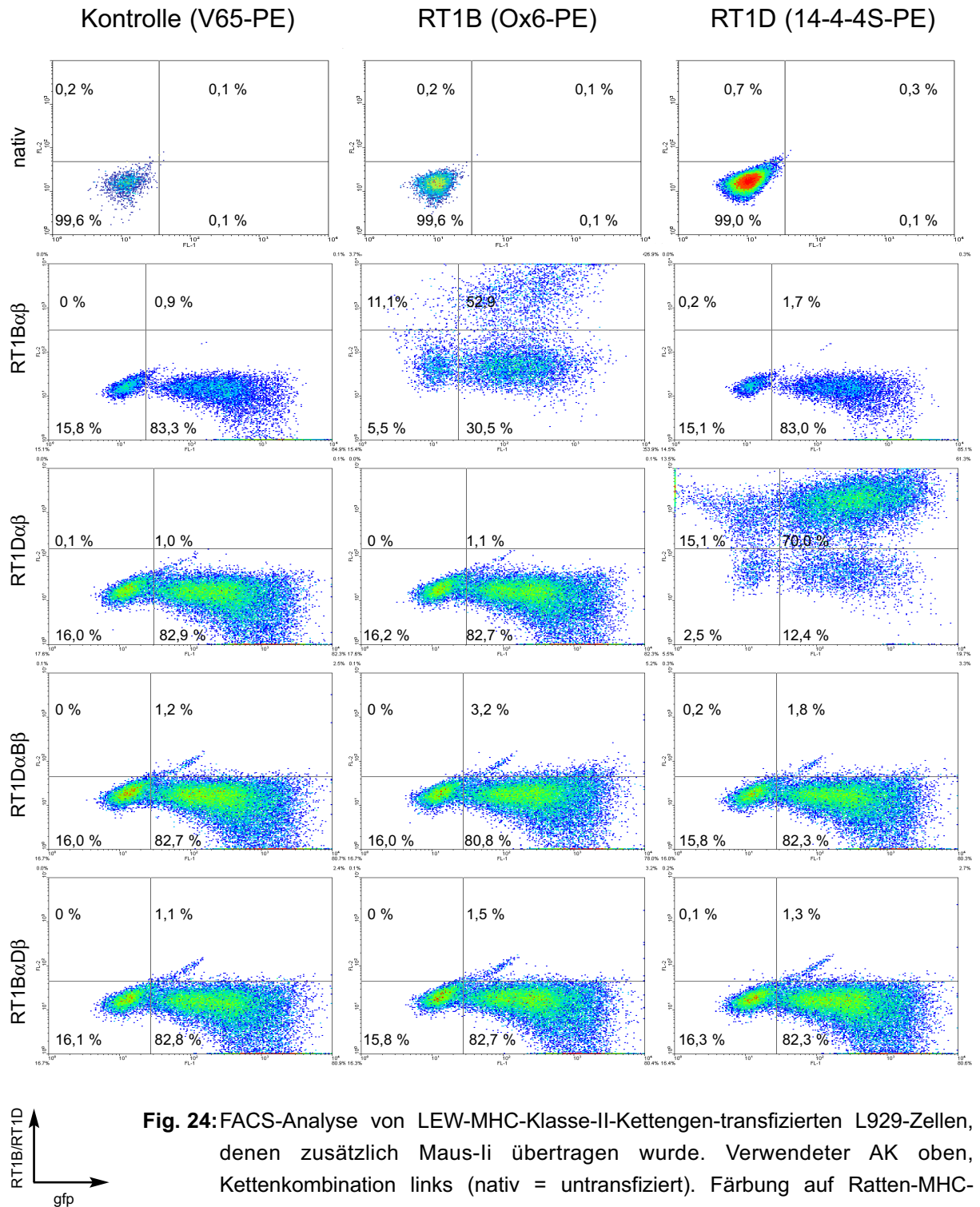
Die Ergebnisse dieser Transfektion sind in Fig. 23 (P80-Zellen) und Fig. 24 (L929-Zellen) dargestellt mit jeweils komplett untransfizierten (Ii-negativ) Kontrollen in der ersten Zeile.

Die Zelllinien zeigten eine Expression regulären RT1B^I mit etwa 72 % bei P80-Zellen und 65 % bei L929-Zellen. Die RT1D^I-Expression lag für P80-Zellen bei etwa 50 % und für L929-Zellen bei 85 %, so dass insgesamt von einer guten Transfektionseffizienz ausgegangen werden kann. Im Falle der gemischten Ansätze, im engeren Sinne des mit den verwendeten AK nachweisbaren RT1D^IαB^Iβ, konnte keine klare Oberflächenexpression detektiert werden. In P80-Transfektanten zeigte dieser Ansatz gegenüber sicher negativen Zelllinien oder nicht detektierbaren Kettenkombinationen (RT1B^IαD^Iβ) eine etwa 1 (14-4-4S) - 2,5 % (Ox6) höhere Fluoreszenz, bei L929-Zellen lag diese ebenfalls 0,5 (14-4-4S) - 2 % (Ox6) höher. Bei beiden lagen die mutmaßlich doppelpositiven Zellen grafisch im Bereich der höchsten Ii-Konzentration (gfp-Intensität). Gleichzeitig ließ sich vor allem bei RT1B^I⁺-P80-Zellen ein Anstieg der MHC-Klasse-II-Expression bei verstärktem Vorliegen von Ii beobachten. In L929-Zellen war dies zusätzlich bei RT1D^I-Transfektanten nachzuweisen.



RT1B/RT1D
gfp

Fig. 23: FACS-Analyse von LEW-MHC-Klasse-II-Kettengen-transfizierten P80-Zellen, denen zusätzlich Maus-Ii übertragen wurde. Verwendeter AK oben, Kettenkombination links (nativ = untransfiziert). Färbung auf Ratten-MHC-Klasse-II-Moleküle und gfp



3.3.4 Nachweis der RT1B^l β -Kette in isotypisch gemischten und regulären L929-Transfektanten im Western Blot

Da unter Kotransfektion mit der invarianten Kette der Maus keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein gemischter Isotypen getroffen werden konnte, wurde nachfolgend ein Western Blot zum Nachweis intrazellulärer MHC-Klasse-II-Produkte unter reduzierenden Bedingungen (s. 2.2.13) durchgeführt .

Die in 3.3.3 erstellten zunächst Ii- und anschließend mit unterschiedlichen RT1B^l/RT1D^l-Kettengenkombinationen transduzierten L929-Zellen wurden lysiert und das gewonnene Proteingemisch zusammen mit einem Proteinmarker in einer SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.2.12). Die Separation wurde in zweifacher Ausfertigung durchgeführt, um gleichzeitig eine Detektion der RT1B^l β -Kette mit dem mAK Ox6 und der RT1D^l α -Kette mit 14-4-4S durchführen zu können.

Nach der Übertragung auf die Nitrocellulose-Membran wurden die o. g. AK in Konzentrationen von 1/500 (Ox6) und 1/250 (14-4-4S) in Blockierungspuffer eingesetzt und gemäß dem zugehörigen Protokoll weiterbehandelt.

Fig. 25 zeigt einen Ausschnitt einer entwickelten Fotografie.

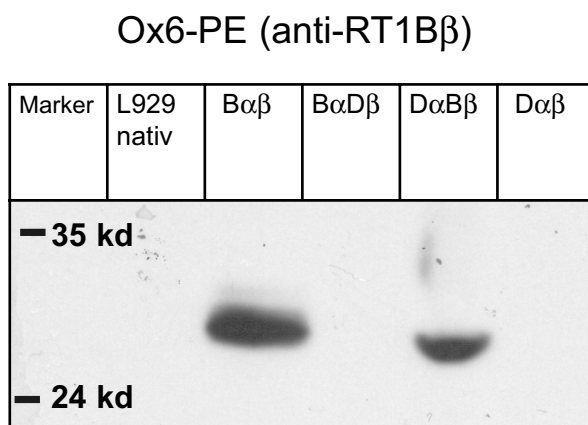


Fig. 25: Western-Blot Analyse von LEW-MHC-Klasse-II-transfizierten L929-Zellen (Ii-positiv) mit Anti-RT1B β -mAK (Ausschnitt). Jeweilige Kettenkombination angeben (L929 nativ nur Ii-transfiziert). Verwendung eines 180 kD-Protein-Markers (Spalte 1)

Die Detektion der RT1D^l α -Kette mittels 14-4-4S verlief ergebnislos, d.h. weder im regulär RT1D^l-transfizierten Ansatz, der in 3.3.3 eine hohe Oberflächenexpression zeigte, noch im gemischten Ansatz RT1D^l α B^l β konnte diese Kette nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In der Analyse mit Ox6 zeigte sich im RT1B^l-transfizierten Ansatz eine Bande von hoher Intensität und erwartetem Gewicht (~ 28 kD). Ebenfalls ließ sich im isotypisch gemischten Ansatz RT1D^l α B^l β eine spezifische Bande detektieren, die sowohl in Intensität als auch Molekulargewicht geringer ausfiel als die des korrekt RT1B^l-transfizierten.

3.3.5 Gemischte Isotypen lassen sich nicht durch intrazelluläre Färbung in transfizierten L929-Zellen nachweisen

Da im Western Blot kein Nachweis der RT1D^l α -Kette im RT1D^l $\alpha\beta$ - und RT1D^l $\alpha\beta$ -Ansatz möglich war, wurde nachfolgend eine intrazelluläre Färbung mit den im Western Blot analysierten L929-Zelllinien durchgeführt.

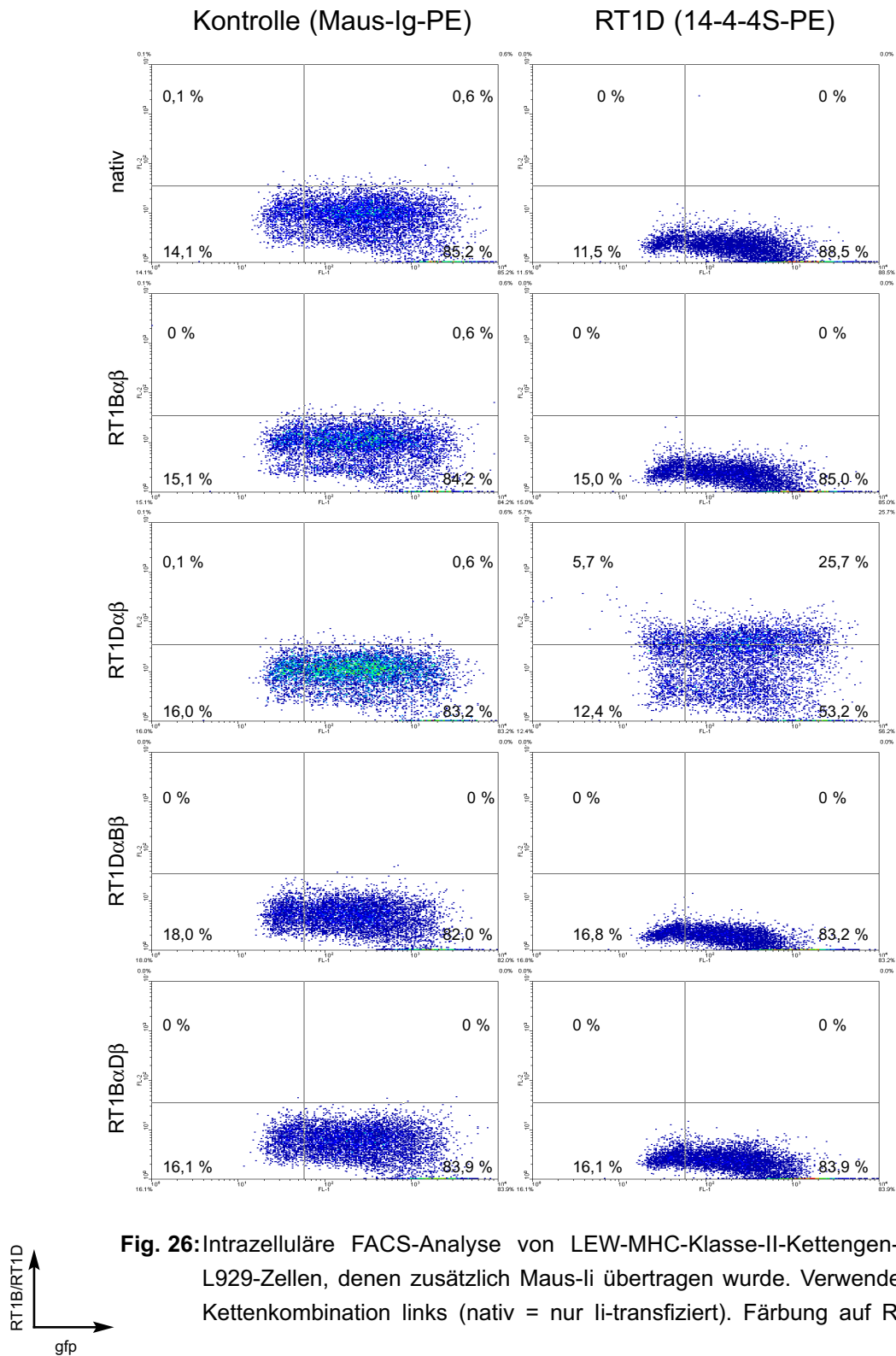
Entsprechend Protokoll 2.3.15.2 wurde ein PE- bzw. unkonjugierter 14-4-4S-AK (anti-RT1D^l α) in einer Konzentration von 1/500 verwendet bzw. als Isotypkontrolle PE-konjugiertes Maus-Ig eingesetzt.

Vor der Permeabilisierung der Zellmembran musste zunächst oberflächliches RT1D^l durch unkonjugierte AK blockiert werden. Um den Einsatz einer dafür ausreichenden Konzentration zu überprüfen, wurden als Kontrollansatz RT1D^l-Transfektanten mit unkonjugiertem 14-4-4S inkubiert und nach einmaligem Waschen mit jetzt PE-konjugiertem AK gefärbt. Bei ausreichender Konzentration sollten sich diese Zellen in der FACS-Analyse negativ darstellen, da der PE-konjugierte AK durch die Blockade nicht mehr an Oberflächen-RT1D^l-Moleküle binden kann. Die FACS-Analyse dieses Ansatzes ist in Fig. 27 gezeigt, wobei die Quadrantensetzung der in Fig. 26 benutzten entspricht und eine bereits ausreichende Blockade durch eine 14-4-4S-Konzentration von 1/500 dargestellt ist.

In der Auswertung (Fig. 26) zeigte sich, dass die Konzentration des Kontroll-AK Maus-Ig-PE so hoch gewählt worden war, dass gegenüber Negativergebnissen in der Färbung mit 14-4-4S ein großer Unterschied bestand und daher, auch wenn die Quadranten nach der Isotypkontrolle gesetzt wurden, ein Vergleich innerhalb der 14-4-4S-gefärbten Ansätze in der Ergebnisbeurteilung sinnvoller ist.

In der Analyse RT1D^l-transfizierter Zellen zeigte sich die erwartete Anfärbung. Dabei war die Prozentzahl positiver Zellen aufgrund der o. g. Methode der Quadrantensetzung etwas geringer als in der Oberflächenexpression in Fig. 24. Hingegen zeigte die Färbung RT1D^l-Zellen mit dem reaktiven AK 14-4-4S im Vergleich zu Fig. 26 die erfolgreiche Permeabilisierung der Zellen.

In den isotypisch gemischten Ansätzen ließ sich sowohl im Vergleich zur Isotypkontrolle als auch untereinander keine positive Färbung darstellen.



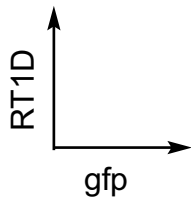
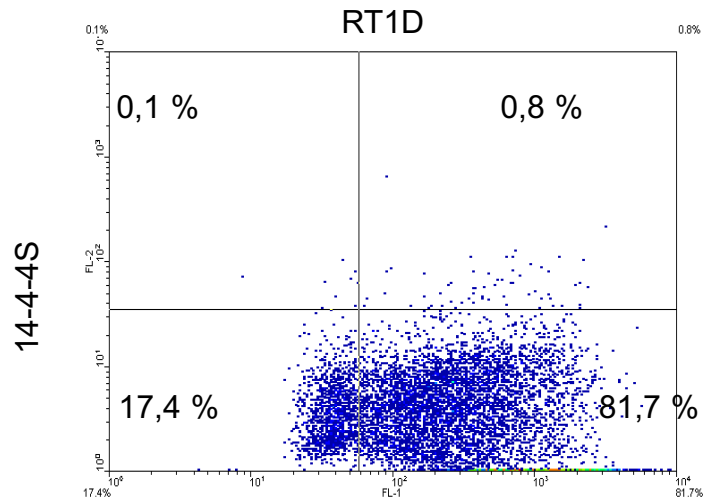


Fig. 27: Kontrollfärbung RT1D-transfizierter L929-Zellen mit PE-konjugiertem 14-4-4S (anti-RT1D α -mAK) nach Blockade mit unkonjugiertem 14-4-4S. Fluoreszenz 1 bedingt durch li-assoziiertes gfp.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine Funktionalitätsuntersuchung der LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle RT1B^I und RT1D^I. Dabei sollten vor allem Unterschiede in der Präsentationsfähigkeit verschiedener Sag-Gruppen analysiert und mit der Präsentation durch HLA-DR1 verglichen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Generierung gemischter Isotypen aus RT1B^I-/RT1D^I-Einzelketten. Hierfür wurden 2 Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen mit LEW-MHC-Klasse-II-Kettengenen transfiziert und eine Expressionsanalyse der übertragenen Gene durch extra- und intrazelluläre Nachweismethoden vorgenommen.

4.1 Expression von LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen in L929-Zellen

Als Präsentatoren für Ag und Sag wurde die murine Fibroblastenzelllinie L929 verwendet. Durch retroviralen Gentransfer wurden in diese Zellen RT1B^I- bzw. RT1D^I-Kettengene übertragen und MHC-Klasse-II-Molekül⁺-Zellen durch FACSort angereichert (s. Fig. 4). Dieser Vorgang ermöglichte ähnliche Expressionsraten und daher auch einen besseren Vergleich zwischen beiden Präsentationsmolekülen. Die verwendeten AK 14-4-4S und Ox6, die bei dieser Färbung verwendet wurden, konnten gleichzeitig aufgrund ihrer Kreuzreaktivität mit Analoga der Maus ausschließen, dass auf nativen L929-Zellen konstitutionell MHC-Klasse-II-Moleküle vorliegen.

Die erstellten Zelllinien und HLA-DR1⁺-P3/2 + CD80-Zellen wurden mit verschiedenen Ag und Sag auf ihre Stimulationsfähigkeit gegenüber reaktiven TZH und Ratten-T-Lymphozyten getestet.

4.2 Stimulation von TZH durch Peptidantigene und bakterielle Sag

RT1B^I- und RT1D^I-transfizierte sowie native L929- und HLA-DR1⁺-P3/2 + CD80-Zellen wurden mit den bakteriellen Sag SEB, SEC1-3, MAS und YPM auf Stimulation des reaktiven TZH 53/4 (*identisch mit TZH 35/1, Kreiss et al., 2004*) getestet.

In der Präsentation von SEB und SEC1-3 (Fig. 5) zeigten sich bereits bei niedrigen Sag-Konzentrationen hohe IL-2-Antworten des TZH in Gegenwart von HLA-DR1 (P3/2 + CD80-Zellen). RT1B^I-/RT1D^I-Transfektanten zeigten die stärkste 53/4-Reaktion in Anwesenheit von SEB (ca. 50 % im Vergleich zu HLA-DR), während die bei SEC1-3 detektierten IL-2-Werte nur zwischen 5-10 % der in Gegenwart humaner Präsentationsmoleküle beobachteten Werte erreichten. Zusätzlich setzte eine TZH-Reaktion auf RT1B^I-/RT1D^I-präsentierte Sag im

Allgemeinen erst bei 25-fach höherer Konzentration ein. Die schlechte Präsentation von SEB und SEC1 durch Ratten-MHC-Klasse-II-Moleküle wurde bereits für Rattenlymphknotenzellen demonstriert (*Herrmann et al., 1994*), wobei sich erst nach Zugabe von HLA-DR⁺-Zellen eine Proliferation von T-Lymphozyten nachweisen ließ. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass die verwendeten Sag nur schlecht an präsentatorische Moleküle der Ratte binden konnten und keine primäre Areaktivität vorlag. Eine schlechte Präsentation von SEB speziell durch RT1D^l wurde von *Karaüzüm (2003)* beobachtet.

Die Ergebnisse hier zeigen, dass LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle in einem gewissen Maß zur Präsentation von SE fähig sind, da alle verwendeten Sag höhere IL-2 Antworten in Gegenwart der RT1B^l/RT1D^l-Transfektanten erreichten als bei nativen L929-Zellen, bei denen sich bis auf SEB keine Stimulation nachweisen ließ. Der Vergleich innerhalb der Ratten-Präsentationsmoleküle liefert in allen SE-Stimulationen eine bessere Stimulation durch RT1B^l, wobei der Unterschied für SEB und SEC3 am größten und für SEC2 am geringsten ist. In Experimenten mit humanen und Maus-MHC-Klasse-II-Isotypen wurde von *Herman et al., (1990)* hingegen beschrieben, dass HLA-DR1 und H2-E (RT1D-Analoga) besser SEB und SEC1 präsentieren als RT1B-Analoga. Auch *Herrmann et al., (1989)* konnten die bevorzugte Bindung von SEB an HLA-DR zeigen. Die hier gezeigte Präferenz könnte zum Einen auf einer geringeren Expression an RT1D^l beruhen, die sich allerdings in Oberflächenfärbungen nicht bestätigen ließ, oder auf einer geringeren Vitalität der RT1D^l-Transfektanten in der Versuchsdurchführung. Da gleichzeitig durchgeführte Stimulationen mit MAS und YPM jedoch eine starke RT1D^l-Präsentation zeigten und die IL-2-Antwort in den SE-Fällen bei RT1B^l- teilweise über 50% stärker als bei RT1D^l-Transfektanten war, ist von einer besseren Stimulation durch RT1B^l auszugehen.

Analog zu der hier gezeigten TZH-Reaktion in Gegenwart untransfizierter L929-Zellen konnte bereits *Karaüzüm (2003)* in einer ähnlichen Versuchsdurchführung mit MHC-Klasse-II-293T-Zellen eine Stimulation durch SEB feststellen.

Eine mögliche Ursache dafür könnte die Induktion endogener Maus-MHC-Klasse-II-Moleküle in L929-Zellen sein. Da ein Test auf H2-A/E- bzw. RT1B/RT1D-Oberflächenexpression nur vor und nicht nach der Stimulationsdurchführung erfolgte, ist dies nicht auszuschließen. Allerdings wäre die wahrscheinlichste Ursache dafür die Wirkung TZH-produzierter Mediatoren wie z.B. IFN- γ . Da jedoch in keiner anderen Sag-Stimulation eine Aktivierung durch untransfizierte L929-Zellen auftrat, ist eine andere Annahme wahrscheinlicher. *Herrmann et al. (1991)* konnten beobachten, dass SEB in Gegenwart von Maus- oder humanen Zelllinien ohne präsentatorische Moleküle CD8⁺-T-Zellen V β -spezifisch aktivieren kann. Dies könnte durch eine direkte Bindung und Kreuzvernetzung von SEB an den TZR des Hybridoms erklärt werden, wie sie für humane T-Zellen zu bestehen scheint (*Fleischer et al., 1988*), oder durch eine Präsentation mittels bisher unbekannter Moleküle, die ebenfalls stimulierend auf 53/4 wirken kann.

Während die erste Möglichkeit aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse unwahrscheinlich ist,

konnte beispielsweise eine Bindung von SEB an Nicht-MHC-Klasse-II-Moleküle, allerdings ohne Stimulation, von *Rogers et al. (1995; 1997)* beobachtet werden.

Ein direkter Vergleich zwischen humanen und LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen ist aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Zelllinien nicht möglich. Die bereits erwähnten Veröffentlichungen über eine nicht nachweisbare Stimulation in Rattenlymphknotenzellen durch SEB und SEC1 bzw. von RT1D^l-Transfektanten durch SEB lassen jedoch den Schluss zu, dass der hier beobachtete Unterschied zwischen humaner und LEW-Präsentation tatsächlich vorhanden und unter Umständen durch die hohe RT1B^l-/RT1D^l-Expression der Transfektanten in vivo noch größer ist. In einer ähnlichen Versuchsdurchführung in der Arbeitsgruppe Herrmann konnte zudem ein entsprechendes Ergebnis für die hier verwendeten L929-Zellen und eine andere P3/2-Zelllinie ohne das kostimulatorische Ratten-CD80 ermittelt werden (*Herrmann, Thomas; persönliche Mitteilung*), so dass ein bedeutsamer Einfluss dieses Moleküls ausgeschlossen werden kann.

In der TZH-Stimulation durch MAS (Fig. 6) ergab sich nur in Anwesenheit HLA-DR1- und RT1D^l-positiver Zellen eine IL-2-Antwort durch 53/4. Anders als bei SE zeigte sich diese bei LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen im Vergleich zu humanen schon bei geringerem MAS-Gehalt, auch wenn bei der höchsten MAS-Konzentration HLA-DR1 besser stimulierte. RT1B^l-Transfektanten und native L929-Zellen aktivierten nicht, so dass von einer RT1D^l-getragenen Stimulation ausgegangen werden kann. Dies konnte zusätzlich in einer von Prof. Rink, RWTH Aachen durchgeführten FACS-Färbung der hier verwendeten L929-Transfektanten mit einem MAS-gfp-Fusionsprotein bestätigt werden (*persönliche Mitteilung*), in der sich bei nativen L929-Zellen und RT1B^{l+}-Transfektanten keine Bindung nachweisen ließ. Hingegen zeigte sich eine deutliche Anlagerung des Fusionsproteins an RT1D^{l+}-Zellen, übereinstimmend mit der bereits beschriebenen präferentiellen MAS-Bindung an die RT1D-Homologa HLA-DR und H2-E durch *Etongue-Mayer et al., 2002*.

Die YPM-Präsentation (Fig. 6) durch RT1B^l und RT1D^l war in etwa vergleichbar, zeigte aber im Vergleich zu HLA-DR1⁺-Zellen deutlich niedrigere IL-2-Werte. Zudem ließ sich eine TZH-Antwort bei P3/2 + CD80-Zellen im Gegensatz zu L929-Transfektanten schon bei der geringsten Sag-Konzentration nachweisen, so dass eine bessere Stimulation durch humane Präsentationsmoleküle zu bestehen scheint.

Die erstellten Transfektanten wurden ebenfalls auf Präsentation von Peptidantigenen gegenüber reaktiven TZH getestet (Fig. 7). Das gpMBP-spezifische TZH 53/4 zeigte nur in Gegenwart RT1B^{l+}-Zellen eine deutliche IL-2-Antwort, so dass eine RT1B^l-restringierte Erkennung durch das TZH (*Kreiss et al., 2004*) bestätigt werden konnte. Die geringe Antwort in Gegenwart der RT1D^{l+}-Transfektanten bei der höchsten verwendeten Ag-Konzentration spricht dafür, dass 53/4 RT1D^l-präsentiertes gpMBP in eingeschränktem Umfang erkennen kann.

In der Stimulation mit L.casein wurden die bisher verwendeten Zelllinien und zusätzlich

Thymozyten miteinander verglichen. Als reaktives TZH diente in diesem Fall der in der AG Herrmann erstellte Klon 19. Eine IL-2-Antwort fand sich nur bei Thymozyten und RT1D^L-Transfektanten und bestätigt somit die durch *Karaiüzim (2003)* gezeigte RT1D^L-Restriktion der L.casein-Reaktivität dieser Zelllinie. Allerdings war eine TZH-Aktivierung erst bei der höchsten gewählten Ag-Konzentration von 100 µg/ml nachweisbar und im Vergleich zu gpMBP wesentlich geringer ausgeprägt. Die Ursache dafür liegt möglicherweise in einer allgemein relativ schlechten Bindung des Ag an RT1D^L oder einer geringeren Affinität des TZR. Zusätzlich zeigte sich nach einer ersten Stimulation (Daten nicht gezeigt) in einer FACS-Analyse eine erheblich geringere TZR-Dichte bei Klon19 als bei 53/4, woraufhin Zellklone durch Grenzverdünnung isoliert und solche mit hoher TZR-Expression, die allerdings nicht die des 53/4-TZH erreichte, in Kultur genommen und hier verwendet wurden.

Die Präsentationseigenschaften der RT1D^L-Transfektanten sind allerdings prinzipiell als gut einzustufen, da die durch sie bewirkte Klon19-Antwort die der Positivkontrolle (Thymozyten) sogar übersteigt.

4.3 Stimulation von LEW-Lymphozytenpopulationen durch bakterielle Sag

Zur Bestätigung der durch TZH-Stimulation gewonnenen Ergebnisse wurden die Sag SEC1, MAS und YPM und die in 4.2 verwendeten Zelllinien als Stimulatoren für LEW-T-Zellen eingesetzt, die aus Lymphknotenzellen durch Aufreinigung in einer Nylonwollsäule gewonnen wurden.

In einem Vorversuch zur Untersuchung dieser Aufreinigungsmethoden, bei dem DZ der LEW-Ratte als Präsentatoren eingesetzt wurden (s. 3.1.1), war bereits aufgefallen, dass ein Restbestand MHC-Klasse-II⁺-Zellen in der zu stimulierenden Population in einem gewissen Umfang zur Gesamtstimulation beitrug. So war auch in Abwesenheit DZ eine Proliferation Sag-spezifischer Vβ-T-Zellen bei Gabe von YPM und MAS nachweisbar. Allerdings konnte unter gemeinsamer Betrachtung der als Stimulationsmarker gewählten Indizes, sprich einer Sag-spezifischen Verschiebung der Vβ-Verteilung in T-Zellblasten und einer Erhöhung des Blastenanteils innerhalb der Cβ⁺CD4⁺-Population, diese Aktivierung klar von einer durch hinzugefügte APZ getragenen Stimulation unterschieden werden.

In der Kontrollgruppe ohne Sag war ein unspezifischer Anstieg des Blastenanteils in Cβ⁺-Zellen nach Zugabe der Fibroblastenzelllinien zu beobachten (Fig. 9). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Fremdreaktion der T-Zellen auf Proteine des zugesetzten Mediums oder der transfizierten Zelllinien oder eine allein durch die Adhärenz zwischen den verschiedenen Zellen bedingte Größenzunahme. Eine Sag-bedingte Proliferation ist allerdings aus der Unabhängigkeit vom MHC-Klasse-II-Status der APZ und den in allen Ansätzen sehr ähnlichen Veränderungen auszuschließen.

Wie von *Kreiss et al. (2004)* beschrieben, proliferierten in der Stimulation mit SEC1 (s. Fig.10)

V β 8.2 in Anwesenheit HLA-DR⁺-P3/2 + CD80-Zellen sehr ausgeprägt und V β 8.5 in geringem Umfang.

In Abwesenheit von MHC-Klasse-II-Molekülen blieb die in der Mediumkontrolle beobachtete Hierarchie der einzelnen V β -Gruppen erhalten. Dies galt ebenfalls für RT1D^l-Transfektanten, so dass von einer sehr geringen bis fehlenden Stimulation durch dieses Molekül ausgegangen werden muss, wie sie sich bereits in der TZH-Stimulation zeigte. Bei RT1B^l-Zellen veränderte sich die Hierarchie der V β -Gruppen im Sinne der bei HLA-DR-Präsentation beobachteten Verschiebung. Diese war zwar in ihrem Ausmaß wesentlich geringer, aber dennoch klar von der nicht-stimulierenden Ansätze zu unterscheiden. Zusätzlich zeigte sich in der Analyse des Blastenanteils ein deutlicher Anstieg innerhalb der V β 8.2-Population (nicht gezeigt), so dass sich die in 4.2 diskutierten Ergebnisse einer RT1B^l-getragenen SEC1-Stimulation unter den dort aufgeführten Gesichtspunkten bestätigen lassen.

In der Auswertung der MAS-Stimulation (Fig. 11) zeigte sich der durch MHC-Klasse-II⁺-Zellen der Lymphknotenpopulation verursachte Aktivierungsbeitrag besonders ausgeprägt. Gegenüber der Mediumkontrolle war in MHC-Klasse-II-negativen Ansätzen eine Proliferation von V β 8.2 und 8.5 zu beobachten, wie sie bei einer MAS-spezifischen Aktivierung, zumindest für V β 8.2, zu erwarten war (*Kreiss et al., 2004*). Hier ist möglicherweise ausschlaggebend, dass, wie in der TZH-Stimulation durch MAS zu beobachten, RT1D^l ein HLA-DR1 zumindest ebenbürtiges, wenn nicht sogar überlegenes Präsentationsmolekül ist und dadurch anders als bei SEC1 bereits ein geringer Anteil präsentierender Zellen in der Lymphknotenpopulation eine starke Proliferation tragen kann.

HLA-DR1⁺- und RT1D^l-APZ führten zu einer ausgeprägten Proliferation von V β 8.2 und 8.5, aber nicht V β 16. Zudem scheint, wie aus den höheren Blastenanteilen innerhalb der C β ⁺-Zellen ersichtlich, sogar eine leicht bessere Präsentation durch RT1D^l vorzuliegen, was ebenfalls dem Ergebnis unter 4.2 entspräche. Allerdings zeigte sich bei RT1B^l-Transfektanten, anders als aus der TZH-Stimulation zu erwarten war, eine Sag-spezifische T-Zellproliferation, die bezüglich der V β -Verschiebung zwar nicht eindeutig von der MHC-Klasse-II⁻-Ansätze zu unterscheiden ist, in der Darstellung des Blastenanteils jedoch zwischen diesen und HLA-DR1⁺- und RT1D^l-Ansätzen liegt. Für die Analyse der MAS-Stimulation ist weiterhin nicht unerheblich, dass zwar in den untersuchten V β -Gruppen V β 8.2 und 8.5 reagieren, die stärkste Proliferation in Ratten-T-Zellen nach MAS-Gabe jedoch für V β 6 beschrieben ist (*Baccala et al., 1992*). Analog den Ergebnissen für YPM und der dort vorliegenden, ausgeprägten V β 8.2-Dominanz in der Sag-Reaktion, hätte durch Einbeziehung der V β 6-Gruppe eine bessere Beurteilung der RT1B^l-abhängigen Stimulation erreicht werden können, was aber auf Grund fehlender reaktiver mA-K nicht möglich war.

Die Ergebnisse der Stimulation mit YPM (Fig. 12) entsprachen weitgehend den aus der TZH-Reaktion hergeleiteten Erwartungen. Eine durch MHC-Klasse-II⁺-Lymphknotenpopulation bedingte Aktivierung ließ sich auch hier in MHC-Klasse-II⁻-Ansätzen beobachten, war allerdings in ihrem Ausmaß deutlich geringer als in Anwesenheit transfizierter Zellen. YPM wird sowohl

durch HLA-DR1, als auch durch RT1B^I und RT1D^I präsentiert und stimuliert vor allem V β 8.2⁺-T-Zellen.

In Gegenwart der P3/2+CD80-Zellen zeigt sich auch der höchste Blastenanteil in C β ⁺-T-Zellen. Da dieser Wert als Marker für die Gesamtstärke der T-Zellstimulation verwendet wurde, kann diese Beobachtung das in 4.2 beschriebene Ergebnis einer besseren Präsentation durch HLA-DR1 bestätigen. Allerdings können die dort beobachteten starken Unterschiede der 53/4-Antwort zwischen den MHC-Klasse-II-Molekülen beider Spezies nicht im selben Umfang nachgewiesen werden, da die Sag-spezifischen Veränderungen der V β - und Blastenanteile auch für die präsentatorischen Moleküle der LEW-Ratte sehr ausgeprägt sind.

4.4 Reaktivität des TZH RG17 und gemischter T-Zellpopulationen auf LEW-MHC-Klasse-II-präsentiertes vSag7

Neben der Präsentation bakterieller Sag durch RT1B^I und RT1D^I wurde die Aktivierung des durch das endogene Retrovirus der Maus *mtv7* kodierten vSag7 analysiert, wofür die in 4.1 beschriebenen Zelllinien durch Kalziumphosphatpräzipitation mit der vSag7-kodierenden orf-Sequenz oder als Negativkontrolle nur mit dem leeren Vektor supertransfiziert wurden. Beide Zellarten wurden durch G418 selektioniert. Das Vorhandensein der orf-Sequenz wurde mittels RT-PCR und nachfolgender PCR mit Insert-spezifischen Primern qualitativ nachgewiesen (Fig. 13). Als Vergleich dienten HLA-DR1- und vSag7⁺-3A5-Zellen sowie das H2-A/E- und *mtv7*⁺-B-Zelllymphom LBB 3.4.16. 3A5-Zellen wiesen ebenfalls das orf-kodierende Insert auf, während LBB 3.4.16-Zellen in der PCR negativ blieben. Dies ist vermutlich durch eine fehlende Anlagerung der verwendeten Primer an die native orf-Sequenz bedingt, da alle anderen vSag7⁺-Zelllinien in der Sequenz zusätzliche Restriktionsenzymsschnittstellen enthielten, die ebenfalls in den Primern vorlagen (*Beutner et al., 1992*).

In einem ersten Versuch (s. Fig. 14) wurden die generierten Zelllinien sowie 3A5- und LBB 3.4.16-Zellen auf Stimulation des vSag7-reaktiven TZH RG17 (*Subramanyam et al., 1993*) getestet. Hier zeigte sich, dass keine der RT1B^I/RT1D^I-exprimierenden L929-Zelllinien, die zusätzlich das vSag7-Gen enthielten, eine IL-2-Antwort auslösen konnte. 3A5-Zellen zeigten nur eine minimale Stimulation und einzig in Gegenwart von LBB 3.4.16 konnte eine gute TZH-Reaktion ermittelt werden. Die Ursachen dafür könnten zum Einen in einer schlechten Bindung von vSag7 an Ratten- und humanes MHC-Klasse-II begründet sein, während H2-E bzw. H2-A als physiologische Präsentationsmoleküle zu einer besseren Stimulation befähigt sind. Da von *Herrmann et al. (1994)* und auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine gute Aktivierung von Ratten-T-Zellen durch die verwendete 3A5-Zelllinie beobachtet werden konnte, erklärt dies jedoch nicht die sehr geringe Reaktion des Hybridoms auf HLA-DR1-präsentiertes vSag7.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abhängigkeit der TZH-Aktivierung von Kostimuli.

LBB 3.4.16 sind als B-Zellen bzw. deren Abkömmlinge allgemein als beste vSag7-Präsentatoren unter verschiedenen APZ beschrieben (*Acha-Orbea et al., 1995*) und in diesem Zusammenhang als wesentlich höherwertiger einzustufen. Weiterhin ist es möglich, dass der Maus-V β 6⁺-TZR des RG17-Hybridoms nur ungenügend zur Interaktion mit vSag7 in einem humanen bzw. Ratten-Präsentationskontext fähig ist. Diese Erklärungen könnten zwar für die mangelnde Stimulation durch RT1B⁺/RT1D⁺-Transfektanten herangezogen werden, machen aber nicht die geringe Reaktivität auf 3A5-Zell-präsentiertes vSag7 plausibel, da deren Präsentationsfähigkeit gegenüber RG17 von *Subramanyam et al. (1993)* bereits gezeigt wurde. Somit bleibt die Ursache der hier beobachteten geringen TZH-Reaktivität auf 3A5-Zellen letztendlich unklar.

Nachfolgend wurden die hier getesteten Zelllinien als Stimulatoren für T-Zellen aus LEW-Lymphknoten verwendet. Auf eine Aufreinigung der Zellen durch Nylonwollsäulenpassage wurde aus der Überlegung heraus verzichtet, dass MHC-Klasse-II⁺-Lymphknotenzellen aufgrund des vSag7-Fehlens keinen Beitrag zur Stimulation leisten würden.

Nach der Inkubation wurden mittels mAK die gleichen V β -Gruppen wie in 4.3 in einer FACS-Oberflächenfärbung analysiert und als Stimulationsmarker ebenfalls Veränderungen der V β -Verteilung und ein Anstieg des Blastenanteils in C β ⁺-T-Zellen, beides allerdings bezogen auf die CD4⁺-Population, verwendet.

Herrmann et al. (1994) zeigten, dass von den hier analysierten LEW-V β -Gruppen 8.2 und 8.5 auf HLA-DR1-präsentiertes vSag7 reagieren, so dass deren Proliferation auch im Fall einer RT1B⁺ oder RT1D⁺-Präsentation zu erwarten war.

Die Auswertung der Stimulationsansätze (s. Fig. 15) zeigte diese Veränderungen in allen vSag7⁺-L929-Zellen mit einem deutlichen Anstieg der V β 8.2⁺-Population und einer aus der Darstellung der Blastenanteile ersichtlichen geringeren Stimulation von V β 8.5 (nicht gezeigt). V β 16 zeigte keine Proliferation auf vSag7. Die als Positivkontrolle eingesetzte 3A5-Zelllinie zeigte nur eine schwache Gesamtproliferation (Blastenanteil in C β ⁺CD4⁺-Zellen), die allerdings ebenfalls mit einer vSag7-spezifischen Reaktion von V β 8.2 und 8.5 einherging. LBB 3.4.16-Zellen waren äußerst effektive T-Zellaktivatoren und bewirkten durch vSag7 eine Stimulation von V β 8.2 und 8.5 (nicht gezeigte Blastenanteile). Die ebenfalls von *Herrmann et al. (1994)* beschriebene zusätzliche Aktivierung der V β 16⁺-Population, die, wie auch in nachfolgenden Versuchen gezeigt, vSag7-unabhängig ist, war allerdings so ausgeprägt, dass in der V β -Zusammensetzung der analysierten Blasten Zuwächse nur in dieser Gruppe zu verzeichnen waren.

Grundsätzlich lässt sich aus dem Stimulationsergebnis eine vSag7-Präsentation durch Ratten-MHC-Klasse-II-Moleküle ableiten, da in allen L929-haltigen Ansätzen nur RT1B⁺ und RT1D⁺ als präsentatorische Moleküle vorhanden waren und die Präsenz des vSag7-Gens eine Sag-spezifische T-Zellreaktion bewirkte. Die Möglichkeit, dass endogenes H2-E bzw. H2-A der L929-Zellen für diese Stimulation verantwortlich war, konnte in einem im Weiteren diskutierten Versuch ausgeschlossen werden.

Unerwartet war jedoch die gut erkennbare Stimulation durch vSag7⁻, jedoch MHC-Klasse-II⁻-L929-Zellen, in deren Anwesenheit sich eine zwar im Vergleich zu RT1B^l- und RT1D^l-Transfektanten geringere Gesamtstimulation beobachten ließ, jedoch in allen anderen Parametern nur geringe Unterschiede bestanden. Als Erklärung hierfür kommen eine Präsentationsmolekül-unabhängige vSag7-Aktivierung oder eine Bindung des Sag an die MHC-Klasse-II-Moleküle der Lymphknotenzellen in Frage.

Um diese Möglichkeiten und auch eine Induktion endogener Präsentationsmoleküle in L-Zellen abzuklären, wurden verschiedene zusätzliche Versuchsreihen durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden MHC-Klasse-II⁻, vSag7^{+/-}-L929-Zellen mit LBB IIV11- und LPS- und Ficoll-behandelten BALB/c- bzw. LEW-Milzzellen auf Aktivierung des TZH RG17 getestet. LBB IIV11 ist eine mtv7-Deletionsvariante von LBB3.4.16, die dieser bis auf den dafür ursächlichen Chromosom-1-Fragmentverlust entspricht, also auch den H2^d-Haplotyp trägt.

Unter diesen Bedingungen (s. Fig. 16) zeigte sich zwar eine RG17-Reaktion bereits auf L929-neo- und BALB/c-Zellen, die allerdings in Gegenwart vSag7-transfizierter L-Zellen deutlich anstieg. Die basale IL-2 Produktion ist vermutlich durch eine unspezifische Aktivierung, vermittelt durch die bereits LPS-stimulierten BALB/c-Zellen und im Medium enthaltene Fremdproteine, bedingt, während für die gesteigerte IL-2-Synthese eine zusätzliche Wirkung durch vSag7 ursächlich ist. Dies wird dadurch unterstrichen, dass LBB IIV11-Zellen in Zusammenhang mit vSag7⁻, nicht jedoch mit vSag7⁻-L929-Zellen aktivierend auf RG17 wirken.

LPS-stimulierte LEW-Milzzellen zeigten keine IL-2-Produktion im Zusammenhang mit vSag7⁻-Transfektanten. Dies entspricht den Ergebnissen unter 3.1.1, in denen ebenfalls keine TZH-Reaktion auf RT1B^l/RT1D^l-vSag7⁻-Transfektanten nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich liegt dies an einer generell schlechten Interaktionsfähigkeit der RG17-Zelllinie mit Ratten-MHC-Klasse-II-Molekülen, da im weiteren Verlauf eine Expansion Sag-reaktiver LEW-V β -Gruppen im Zusammenhang mit LPS-stimulierten LEW-Milzzellen und vSag7 gezeigt werden konnte.

Zunächst wurden jedoch in einer weiteren Versuchsdurchführung durch Nylonwollsäulenpassage aufgereinigte LEW-T-Zellen (ansonsten analog 3.2.3.1) verwendet, deren zugehörige Ergebnisse hier zusammengefasst werden. Es zeigten sich nur bei 3A5-Zellen die vSag7-spezifischen Veränderungen der V β -Untergruppen. Bei allen L929-Zelllinien, die in der ersten polyklonalen Stimulation eine T-Zellaktivierung bewirkten (s. 3.2.3.1), war eine starke Reduzierung der Proliferation auf fast nicht mehr nachweisbare Werte zu beobachten. Eine Sag-bedingte Aktivierung ließ sich am ehesten noch für RT1B^l-Transfektanten nachweisen, da hier beide Stimulationsindizes im Gegensatz zu vSag7-negativen RT1B^l-Transfektanten die größten Veränderungen zeigten. Bei RT1D^l-Transfektanten war keine Stimulation mehr nachweisbar und im Zusammenhang mit nativen, ausschließlich vSag7-transfizierten L-Zellen zeigten sich nur geringe Veränderungen. Dies ist insofern ein unerwartetes Ergebnis, da alle mtv-Sag entweder ausschließlich oder wie im Fall von vSag7

zumindest dominierend im Zusammenhang mit H2-E, dem RT1D-Analogon der Maus, stimulierend wirken (*Acha-Orbea et al., 1995*), auch wenn die Bindung an H2-A in bestimmten Fällen stärker sein kann (*Grigg et al., 1998*). In eine ähnliche Richtung wies auch das Ergebnis der RT1B^l-dominierten Aktivierung bei SEB-Stimulation (s. 4.2 und 4.3).

Dass die Reduktion der MHC-Klasse-II⁺-Population der Responderzellen mit einer ausgeprägten Verringerung der T-Zellstimulation einherging, lässt eine Induktion von Maus-Präsentationsmolekülen in L929-Zellen ebenso unwahrscheinlich wirken wie eine MHC-Klasse-II-unabhängige Aktivierung durch vSag7. Zudem ist auch hier zu beachten, dass die APZ der Lymphknotenzellen vor allem B-Lymphozyten sind, die in ihrer kostimulatorischen Kapazität den transfizierten Fibroblastenzelllinien überlegen sind.

Letztendlich sprechen die Ergebnisse dieser polyklonalen Stimulation und der RG17-Stimulation unter 3.2.3.2 einerseits für eine schlechte vSag7-Präsentation durch die erstellten Zelllinien und andererseits für eine Interaktion der vSag7-produzierenden L929-Zellen ohne präsentatorische Moleküle mit dem MHC-Klasse-II⁺-Anteil der Lymphknotenzellen bzw. H2-A/E-Molekülen der zugefügten LBB IIV11- und BALB/c-Zellen.

In einer weiteren T-Zellstimulation wurden Kombinationen MHC-Klasse-II-negativer-vSag7⁺-Transfektanten mit LBB IIV11- und LPS-behandelten LEW-Zellen als Aktivatoren für gereinigte T-Zellen getestet (s. Fig. 18). Bei der Analyse konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu vSag7-negativen Transfektanten die L929-orf-Zelllinie sowohl alleine, aber wesentlich stärker mit zusätzlichen Maus- bzw. LEW-MHC-Klasse-II⁺-Zellen eine vSag7-spezifische Aktivierung der T-Zellpopulation erreichen konnte. Der Effekt durch Zugabe LPS-stimulierter LEW-Zellen zeigte sich einerseits in einer stärkeren C β ⁺CD4⁺-Blastenanteilzunahme, darüber hinaus aber auch in einer spezifischen Zunahme des Blastenanteils in reaktiven V β -Gruppen gegenüber Ansätzen ohne zusätzliche LPS-Blasten (nicht gezeigt). Dies spricht beides wiederum für einen Austausch von an der Stimulation beteiligten Komponenten, speziell des vSag7 und/oder präsentatorischer Moleküle, zeigt aber zusätzlich auch im Fall der Zugabe LPS-stimulierter LEW-Zellen erneut und in eindeutigerem Umfang, dass LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle zur vSag7-Präsentation fähig sind.

Zusätzlich wurde in einer Färbung auf MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression, der die in den Stimulationsansätzen verbliebenen L929-Zellen nach Versuchsende unterzogen wurden, die Induktion endogener H2-A/E-Moleküle ausgeschlossen (nicht gezeigt).

In einem In-vivo-Experiment, bei dem die gleichen vSag7-positiven und -negativen L929-Zelllinien getrennt in LEW-Ratten appliziert wurden, konnte in den drainierenden Lymphknoten, eine Expansion vSag7-spezifischer V β -Gruppen detektiert werden (Fig. 19), die die vSag7-Präsentation durch LEW-MHC-Klasse-II-Moleküle zusätzlich belegt.

Da sowohl die Ergebnisse der polyklonalen als auch der zweiten RG17-Stimulation ein Zusammenspiel beteiligter Zelllinien an der vSag7-Präsentation nahe legen, stellt sich die Frage, welche Stimulationskomponenten letztendlich an diesem Vorgang beteiligt sind.

Grundsätzlich bestehen die zwei Möglichkeiten, dass vSag7 als gelöstes Protein von produzie-

renden Zellen direkt auf präsentatorische Moleküle anderer Zellen übertragen wird und/oder dass durch Übertragung MHC-Klasse-II-Molekül-tragender Membranfragmente auf vSag7 synthetisierende Zellen, u. U. mit kostimulatorischen Molekülen, diese zur Präsentation befähigt werden.

Für die erste Variante spricht die Beobachtung, dass vSag7 unabhängig von MHC-Klasse-II-Molekülen zur Zelloberfläche transportiert wird und erst dort an diese bindet (*Grigg et al., 1998*). Die für die Stabilisierung von vSag7 benötigte Bindung an präsentierende Moleküle könnte unter den Stimulationsbedingungen, unter denen die Zelllinien dicht beieinander liegen, ebenfalls durch direkte Übertragung auf MHC-Klasse-II-Moleküle der Nachbarzelle erfolgen. *Delcourt et al. (1997)* konnten zeigen, dass die Transfektion MHC-Klasse-II⁻-Maus-Fibroblasten mit dem vSag7-Gen und Kokultur mit vSag7-negativen, jedoch präsentatorische Moleküle der Maus tragenden Fibroblasten, zur Stimulation reaktiver TZH führte. Der Transfer in diesem Versuch war nicht an einen direkten Zellkontakt oder eine vorhergehende Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden, da bei Trennung der beiden Fibroblastenzelllinien durch eine semipermeable Membran ebenfalls eine Stimulation auf der MHC-Klasse-II⁺-Seite erfolgte. Eine detektierbare Stimulation war auch nach Injektion dieser vSag7-positiven Zelllinie in Mäuse zu beobachten.

Auch durch *Reilly et al. (2000)* konnte ein Transfer von vSag7 auf Maus-Klasse-II-exprimierende Zellen nachgewiesen werden, da hier auch der zellfreie Überstand vSag7-produzierender Zellen in Gegenwart H2-A/E⁺-Zellen stimulatив wirkte.

Würde man in den hier gezeigten Versuchen von einem Transfer der präsentatorischen Moleküle auf die vSag7⁺-L929-Zellen ausgehen, so hätte sich dieser ab einem bedeutendem Umfang in der MHC-Klasse-II-FACS-Analyse der L929-Zellen nach der Stimulation darstellen müssen.

Da dies nicht der Fall war und alle Ergebnisse inklusive der angegebenen Quellen für eine Übertragung des gelösten vSag7 sprechen, ist dies, auch wenn eine geringe Übertragung von Präsentationsmolekülen mittels Membranfragmenten nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, auch für die hier gemachten Beobachtungen in der LEW-Ratte die wahrscheinlichste Erklärung.

4.5 Expression gemischter LEW-MHC-Klasse-II-Isotypen

Um die Rolle der α - bzw. β -Kette von RT1B^l/D^l-Molekülen in der Präsentation von Sag und Ag untersuchen zu können, wurde versucht, diese Ketten zur Generierung gemischter Isotypen zu verwenden und im Vergleich zu regulären LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihre Stimulationseigenschaften zu testen.

Erkenntnisse über die Existenz und Funktion iso- und haplotypisch gemischter Moleküle wurden bisher vor allem im Mausmodell gewonnen. *Malissen et al. (1984)* zeigten, dass nach

Übertragung von E^dα- und A^dβ-Kettengenen in L-Zellen ein aus diesen Komponenten bestehendes Molekül oberflächlich exprimiert wurde. Dieses Molekül war in der Lage, verschiedene TZH durch Ag-Präsentation zu stimulieren und warf dadurch die Frage nach einer physiologischen Funktion gemischter Isotypen auf (*Spencer et al., 1989*).

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Existenz von Heterodimeren aus unterschiedlichen Haplo- bzw. Isotypen das Repertoire präsentierender Moleküle erhöht und dadurch von Vorteil sein könnte (*Matsunaga et al., 1990*). Da allerdings aufgrund eines ineffizienten Zusammenbaus oder Transports die Oberflächendichte gemischter Haplo- oder Isotypen normalerweise nur einen Bruchteil der regulärer MHC-Klasse-II-Moleküle erreicht, sind sie möglicherweise auch einer weniger strikten Selektion im Thymus unterworfen (*Sant et al., 1989*). T-Zellen, die von diesen Molekülen präsentierte Selbstproteine erkennen, werden somit u. U. nicht eliminiert und können in der Peripherie, besonders unter den Expressions-steigernden Bedingungen einer Entzündung an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beteiligt sein. Auch eine potentielle Präsentation von vSag7 durch gemischte Maus-Isotypen wurde von *Anderson et al. (1989)* beschrieben.

Neben der Existenz gemischter Isotypen in der Maus ist eine Expression unter bestimmten Bedingungen auch in menschlichen Zellen (*Lotteau et al., 1987*) sowie in Versuchen mit Kettengenen zweier verschiedener Spezies beobachtet worden. So konnten *Norcross et al. (1986)* zeigen, dass nach Übertragung von H2-A^dβ in eine humane Zelllinie diese HLA-DRαA^dβ-Dimere bildete und damit zusätzlich der Theorie einer bevorzugten Dimerbildung aus zueinander homologen MHC-Klasse-II-Isotypen widersprach, da A^dβ DQβ homolog ist. Ebenfalls beschrieben sind funktionelle DRαE^bβ-Heterodimere in transgenen Mäusen (*Fukui et al., 1993*) sowie aus Hamster- und Maus-Ketten gemischte MHC-Klasse-II-Moleküle nach Übertragung der Mausketten Gene in Hamsterzellen (*Malissen et al., 1984*).

In dieser Arbeit wurden durch retroviralen Gentransfer die RT1B^l/RT1D^l-Einzelkettengene in isotypisch normaler und gemischter Konfiguration in zwei Zelllinien übertragen und diese mittels mAK auf Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen getestet. Die beobachteten Dichtewerte für reguläres RT1B^l und RT1D^l galten als Maß für die Transfektionseffizienz und als Referenzwert für die Expressionsrate. Da von den verwendeten AK Ox6 spezifisch an die RT1B^lβ-Kette und 14-4-4S an die RT1D^lα-Kette bindet, war von vornherein eine Detektion gemischter Isotypen nur im Ansatz RT1D^lαB^lβ zu erwarten.

In einem ersten Ansatz wurde das mit dem Ratten-CD80-Gen transduzierte Mausmastozytom P80 als Transfektionsziel verwendet. Die in Fig. 20 dargestellte FACS-Analyse zeigt eine Oberflächenexpression regulärer RT1B^l- und RT1D^l-Moleküle von ca. 80 bzw. 70 %. Hingegen ließen sich in keiner der isotypisch gemischten Konfigurationen MHC-Klasse-II-Moleküle detektieren. Aufgrund der hohen Dichte regulärer MHC-Klasse-II-Moleküle ist daher davon auszugehen, dass eine Oberflächenexpression gemischter Isotypen aus den Einzelkettengenen der LEW-Ratte in nativen P80-Zellen nicht möglich ist oder auf einem so

geringen Niveau erfolgt, dass sie mit der Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen werden kann.

Die Kettenpaarung eines MHC-Klasse-II-Moleküls liegt innerhalb eines Isotyps mindestens unter Kontrolle der β 1-Domäne. *Germain et al. (1985)* zeigten, dass bei Transfektion mit verschiedenen H2-E β -Allelen in Kombination mit einem H2-E α -Allel hochgradig unterschiedliche Expressionsraten erreicht wurden, deren Ursache sie in der Polymorphie des β 1-Anteils sahen, während von *Gilfillan et al. (1990)* zusätzlich von einem Einfluss der α 1-Domäne ausgegangen wird. In der Paarung von Ketten isotypisch unterschiedlicher Zugehörigkeit wird ebenfalls eine Steuerung durch die β 1-Domäne angenommen, wobei *Lechler et al. (1990)* unterschiedliche Expressionsraten in Experimenten mit humanen und Maus-MHC-Klasse-II-Molekülen auf eine einzelne unterschiedliche AS zurückführen konnten.

Grundsätzlich ist eine Bevorzugung haplo- bzw. isotypisch passender Einzelketten in der Dimerbildung gegenüber gemischten Molekülen (*Sant et al., 1989*) sowie eine stark Allel-abhängige Expressionsrate zu beobachten, wobei die Bildung gemischter Dimere durch asymmetrische Kettensynthese und dadurch unphysiologisch hohe Einzelkettenkonzentrationen stark erleichtert wird. Bei Beheben der Asymmetrieursache, z.B. durch Ersatz einer defekten Kette mittels Transfektion, fällt der Anteil gemischter Dimere wieder auf normal geringe Werte ab. Durch Untersuchung von transfizierten Zellklonen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Kettengenkopien konnte die Präferenz einer Dimerisierung aus passenden gegenüber gemischten Ketten im Fall H2-E^u gegenüber H2-E^u α E^k β beim 4-8-Fachen (*McNicholas et al. 1982*), bzw. im Fall von H2-A^d beim 3-5-Fachen gegenüber H2-E^d α A^d β ermittelt werden (*Sant et al., 1989*).

Da jedoch im hier verwendeten Versuchsaufbau durch die Transfektion mit nur zwei Kettengenen diese begünstigende Asymmetrie grundsätzlich besteht, ist ein auf zu geringen Einzelkettenkonzentrationen beruhendes Expressionsfehlen nicht anzunehmen.

Unterschiede in der Generierung gemischter Haplo- und Isotypen sind ebenfalls bei Verwendung verschiedener Allelkombinationen bekannt.

So konnte im Fall der bereits erwähnten Detektion eines E^d α A^d β -Dimers (*Malissen et al., 1986*) bei Austausch von A^d β mit A^k β trotz asymmetrischer Kettensynthese keine Expression mehr nachgewiesen werden. Ebenso nicht zu exprimieren scheint E^{a/k} α A^k β (*Germain et al. 1986*) zu sein, während E^k α A^f β und E^{k/a} α A^d β detektierbar sind. Dass die Verwendung haplotypisch identischer Ketten in der Genese gemischter Isotypen zu einer schlechteren bzw. nicht nachweisbaren Expression führen kann (E^k α A^k β), als dies unter Verwendung anderer Haplotypen oder gar haplo- und isotypisch gemischter Einzelketten der Fall ist (E^k α A^f β), könnte ebenfalls das hier vorliegende Ergebnis erklären.

Layet et al. (1991) konnten zeigen, dass während sich die Expression haplotypisch identischer H2-E/A-Moleküle durch die Anwesenheit von Ii nur gering steigern lässt, ungünstige Allelkombinationen, die ohne Ii nicht oder nur in sehr geringem Umfang entstehen, an der Oberfläche bis zu 18-fach stärker detektiert werden können. Der begünstigende Effekt von Ii

wurde dabei in einer vermehrten Ausschleusung gemischter Moleküle aus dem rER bzw. dem cis-Golgi vermutet.

Da dieser Effekt ebenfalls für gemischte Isotypen bestehen könnte und die verwendeten P80-Zellen Ii-defizient sind (Herrmann, Thomas; persönliche Mitteilung), wurden diese und die in vorhergehenden Versuchen verwendeten nativen L929-Zellen für weitere Versuche zunächst mit Maus-Ii transfiziert.

Als Marker für eine erfolgreiche Genübertragung in der Transfektion wurde die Expression des Vektor-kodierten gfp gewertet, die sich in der FACS-Analyse detektieren ließ und allgemein für eine gleich hohe oder stärkere Translation des mitübertragenen Ii-Gens spricht. P80- und L929-Zellen waren nach Transfektion zu etwa 80 % positiv für gfp (Fig. 22), allerdings verloren P80-Zellen in Kultur zunehmend an gfp-Intensität (Fig. 23), wofür möglicherweise ein Selektionsnachteil durch die Zielgenintegration in das Zellgenom und dadurch bedingte Expressionsveränderungen endogener Proteine verantwortlich war. Dennoch war der Unterschied zu Ii-untransfizierten Zellen in Bezug auf die gfp-bedingte Fluoreszenz auch im weiteren Verlauf deutlich nachweisbar.

Die Transfektion der nun Ii-positiven P80-(Fig. 23) und L929-(Fig. 24) Zellen mit regulären und isotypisch gemischten Kettenpaargenen führte analog zur ersten Transfektion zur Expression normaler RT1B^L- und RT1D^L-Moleküle. Der Erfolg der Genübertragung war in P80-Zellen in etwa mit dem der ersten Transfektion vergleichbar, während sie in L929-Zellen geringer ausfiel. Die bereits erwähnte Expressionssteigerung regulärer MHC-Klasse-II-Moleküle durch zusätzliche Anwesenheit von Ii konnte ebenfalls in der mit der gfp-Rate korrelierenden MHC-Klasse-II-Dichte in RT1B^L-transfizierten P80-Zellen und RT1B^L/RT1D^L-transfizierten L929-Zellen bestätigt werden und stellt einen Hinweis für die Interaktion von Maus-Ii mit MHC-Klasse-II-Molekülen der Ratte dar.

Ein Nachweis gemischter Isotypen war jedoch in beiden Zelllinien trotz der erfolgreichen Genübertragung nicht eindeutig möglich. Beide Zelllinien wiesen bei Transfektion mit RT1D^LαB^Lβ eine gegenüber sicher negativen Ansätzen um maximal 2,5 % höhere Fluoreszenz in der Detektion mit Ox6 und 14-4-4S auf, die, wie aus der grafischen Darstellung ersichtlich, durch Zellen höchster gfp-Intensität bedingt ist. Sollte es sich dabei tatsächlich um einen gemischten Isotyp handeln, wäre von einer sehr schlechten Exprimierbarkeit gemischter Isotypen in LEW-Zellen auszugehen, die vermutlich kein physiologisches Korrelat in der LEW-Ratte haben.

Zusätzlich könnte dieses Ergebnis ebenfalls die vermutete Interaktion der Maus-Ii mit LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen unterstützen, sofern die Ii-Anwesenheit bei hoher Konzentration tatsächlich auch die Expression gemischter Isotypen ermöglicht. Letztendlich sind jedoch die Unterschiede zu negativen Ansätzen zu gering ausgeprägt, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Durch zwei intrazelluläre Proteinnachweise wurden im Weiteren in L929-Zellen mögliche Ursachen für die schlechte Detektierbarkeit gemischter Isotypen untersucht.

Zunächst wurden Zelllysate der L929-Transfektanten in einem Western Blot unter reduzierenden Bedingungen getestet (s. Fig. 25). Dabei konnte die D α -Kette mit 14-4-4S in mit regulären RT1D^I- und RT1D^I α B^I β -transfizierten Zellen nicht detektiert werden, was entweder durch eine zu geringe AK-Konzentration, einer fehlenden Erkennung durch den Sekundär-AK oder am wahrscheinlichsten durch eine Zerstörung der Epitopstruktur durch Reduktion zu erklären ist.

Die RT1B^I β -Kette hingegen ließ sich durch Ox6 in RT1B^I- und RT1D^I α B^I β -Transfektanten detektieren, die Bande war allerdings im gemischten Isotyp von geringerer Intensität als die des regulären Ansatzes und wies ein niedrigeres Molekulargewicht auf. Diese Beobachtungen könnten einerseits Hinweis auf einen erhöhten intrazellulären Abbau der Kette, unter Umständen bedingt durch eine fehlende und nur geringe Dimerisierung mit RT1D^I α (Intensität), und andererseits ein verändertes Reifungsstadium der β -Kette (Molekulargewicht), die mit einem differenten Glykosylierungsstatus einhergeht, sein.

Da die Detektion im Western Blot für die RT1D^I α -Kette nicht erfolgreich war, wurde eine intrazelluläre Färbung mit PE-konjugiertem mAK gegen RT1D^I α (14-4-4S) durchgeführt (Fig. 26). Die für die intrazelluläre Färbung notwendige Blockade von auf der Zelloberfläche gelegenen Molekülen wurde mittels eines unkonjugierten mAK derselben Spezifität erreicht. Der in Fig. 27 dargestellte Kontrollansatz nicht permeabilisierter Zellen zeigt die ausreichende Blockade durch das Fehlen einer RT1D^I α -Population in RT1D^I-Transfektanten (vgl. Fig. 24). Da allerdings die mIg-PE-Konzentration im weiteren Verlauf sehr hoch gewählt wurde, ergaben sich für sämtliche derart gefärbten Ansätze durch inkomplette AK-Entfernung höhere Fluoreszenzwerte als in MHC-Klasse-II-negativen, 14-4-4S-gefärbten Zellen, so dass ein Vergleich innerhalb der 14-4-4S-Ansätze sinnvoller ist. Für die mit regulären Isotypen transfizierten Zelllinien ergab sich die aus der Oberflächendetektion erwartete Anfärbung, während in gemischten Ansätzen keine MHC-Klasse-II-Expression festgestellt werden konnte.

Dieses Ergebnis ist allerdings nicht grundsätzlich mit der in der FACS-Färbung vermuteten geringen Oberflächenexpression (s. Fig. 23, 24) gemischter Isotypen unvereinbar, da, wie von *Gilfillan et al. (1990)* gezeigt wurde, ungepaarte oder haplotypisch gemischte Moleküle, die an die Zelloberfläche gelangen können, in der Zelle schnell abgebaut werden und auch mittels Immunopräzipitation intrazellulär nicht nachzuweisen sind. Dementsprechend kann dieses Ergebnis auch mit einer bereits vermuteten ungünstigen Bildung von gemischten Isotypen vereinbar sein und muss deren Existenz nicht ausschließen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präsentationsfunktion der LEW-Ratten-MHC-Klasse-II-Moleküle RT1B^I und RT1D^I für verschiedene Super-(Sag) und Peptidantigene sowie die Generierung gemischter MHC-Klasse-II-Isotypen in der LEW-Ratte untersucht.

Sag sind Proteine bakterieller und viraler Herkunft und führen nach Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle durch Interaktion mit dem TZR-V β -Teil zu einer von der TZR-Spezifität unabhängigen Aktivierung von T-Zellen, die bis zu 30 % der Gesamt-T-Zellpopulation eines Organismus erfassen kann. Die dadurch bedingte Mediatorenfreisetzung aus T- oder konsekutiv aktivierten Zellen ist einerseits für die Entwicklung bestimmter akuter Krankheitsbilder wie des toxischen Schocksyndroms, Gastroenteritiden u. a. verantwortlich, kann aber auch potentiell zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und der Entstehung von Autoimmunkrankheiten beitragen.

Zur Untersuchung der LEW-MHC-Klasse-II-Charakteristika wurden zunächst mittels retroviralen Gentransfers RT1B^I- und RT1D^I-Gene in L929-Zellen übertragen und die Oberflächenexpression durch die mAK Ox6 und 14-4-4S nachgewiesen. Anschließend erfolgte der Nachweis einer Sag-Präsentation durch Stimulation des LEW-V β 8.2⁺-TZH 53/4 durch die bakteriellen Sag SEB, SEC1-3, MAS und YPM und von aus Lymphknoten isolierten LEW-T-Zellen durch SEC1, MAS und YPM, die beide mit der durch eine HLA-DR1⁺-Zelllinie getragenen Aktivierung verglichen wurden. Beide Experimente ergaben für die Sag des primär humanpathogenen Staph. aureus eine weitaus stärkere Reaktivität in Anwesenheit humaner gegenüber LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen bei RT1B^I-dominierter Antwort innerhalb der präsentatorischen Rattenmoleküle. Für SEB ergaben sich zusätzlich Hinweise auf eine MHC-Klasse-II-unabhängige Aktivierung.

Das von *Yersinia pseudotuberculosis* produzierte Sag YPM wurde ebenfalls wesentlich besser von humanen als LEW-MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert, zeigte allerdings nur geringe Unterschiede zwischen RT1B^I und RT1D^I.

Für das aus Nagern isolierte Sag von *Mykoplasma arthritidis* MAS konnte eine präferentielle Bindung an RT1D^I mit HLA-DR1-ähnlicher Stimulationskapazität nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden die generierten Zelllinien auf Präsentation der definierten Antigene L.casein und gpMBP gegenüber reaktiven TZH getestet. Dabei konnte die RT1D^I-restringierte Antwort von Klon19 auf L.casein und die RT1B^I-restringierte Antwort von 53/4 auf gpMBP bestätigt werden.

Ebenfalls wurden die erstellten Transfektanten mit einem viralen Sag der Maus, dem vSag7-Gen des mtv7, transfiziert und auf Stimulation des TZH RG17 und von LEW-Lymphozyten getestet. Dabei zeigte sich eine geringe Reaktivität gegenüber den erstellten Transfektanten, die RT1B^I-dominiert war. Gleichzeitig ergaben sich in der Auswertung Hinweise für einen vSag7-Transfer von MHC-Klasse-II⁻-Produzenten auf MHC-Klasse-II⁺-Rattenzellen, die durch weitere Experimente inklusive eines In-vivo-Tests bestätigt werden konnten.

In der Generierung gemischter Isotypen aus MHC-Klasse-II-Einzelkettengeneten der LEW-Ratte konnte gezeigt werden, dass die Übertragung der RT1D^lαB^lβ-Genkombination mit Hilfe eines retroviralen Gentransfers auf P80- und L929-Zellen nicht zu einer sicher detektierbaren Oberflächenexpression führte, auch nicht bei Koübertragung der invarianten Kette der Maus. Durch einen Western Blot unter reduzierenden Bedingungen konnte eine bezüglich Molekulargewicht und Quantität zu einem regulären RT1B^l-Molekül differente RT1B^lβ-Einzelkette in der Kombination RT1D^lαB^lβ nachgewiesen werden.

6. Summary

In the work at hand the presenting function of LEW rat MHC class II molecules RT1B^I and RT1D^I for various superantigens and antigens as well as the generation of mixed MHC class II isotypes in the LEW rat have been investigated.

Superantigens are proteins of bacterial and viral origin, which lead to a TCR-specificity-independent activation of up to 30 % of the individual's T-cell population by interacting with the V β part of the T-cell receptor after having bound to an MHC class II molecule.

The release of mediators by T- and consecutively activated cells causes on the one hand development of acute diseases like toxic shock syndrome, gastroenteritis and other, but can also potentially activate autoreactive T-cells and lead to autoimmune diseases.

In order to examine characteristics of LEW MHC class II molecules, first RT1B^I and RT1D^I chain genes were transferred into L929 cells via a retroviral transfection system and surface expression was demonstrated by using the monoclonal antibodies Ox6 and 14-4-4S. Successively, superantigen presentation was verified by stimulation of the LEW V β 8.2⁺ T-cell hybridoma 53/4 by bacterial superantigens SEB, SEC1-3, MAS and YPM and of LEW T-cells isolated from lymph nodes by SEC1, MAS and YPM. Both results were compared to activation in context of an HLA-DR1⁺ cell line. Experiments showed a much higher reactivity for the superantigens of human pathogen staph. aureus in presence of human versus LEW MHC class II molecules and an RT1B^I dominated answer amongst LEW presentatory molecules. Additionally, clues for MHC class II independent activation were found in case of SEB.

The superantigen of yersinia pseudotuberculosis YPM was also much better presented by human than LEW MHC class II molecules while showing little differences between RT1B^I and RT1D^I.

MAS bound preferentially to RT1D^I and equal stimulative capacity compared to HLA-DR1 could be detected.

Accessorily, generated cell lines were analysed for presentation of peptide antigens L.casein and gpMBP towards reactive T-cell hybridomas, in which RT1D^I-restricted answer of Klon19 to L.casein and RT1B^I-restricted answer of 53/4 to gpMBP could be confirmed.

Also generated cell lines were transfected with a viral mouse superantigen, the vsag7 gene of mtv7, and tested for stimulation of the RG17 T-cell hybridoma and LEW lymphocytes. Low reactivity towards transfected cell lines was detected, which was dominated by RT1B^I. Additionally, evidence for a transfer of vsag7 from MHC class II⁻ producers to MHC class II⁺ rat cells could be found, which was enhanced by additional experiments including in vivo testing.

Attempting to create mixed isotypes consisting of LEW rat MHC class II chains, it was demonstrated, that transferring the gene combination RT1D^I α B^I β via retroviral gene transfer into P80 and L929 cell lines resulted in no certain surface expression, also not under cotransfection of these cells with mouse invariant chain. Using western blot method under reducing

conditions, a RT1B β single chain different to the one of the regular RT1B^l molecule concerning molecular weight and quantity could be detected in the combination RT1D^l α B^l β .

7. Vektorkarten

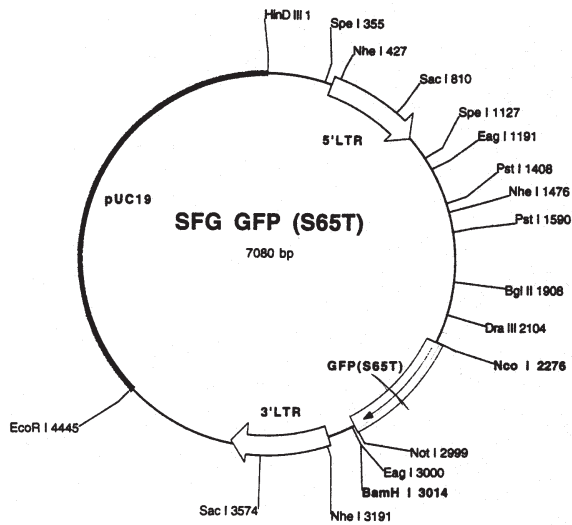


Fig. 28: Vektorkarte des SFG-GFP(S65T)-Plasmids, anstelle der für gfp kodierenden Sequenz wurden ebenfalls Versionen mit den LEW-Einzelkettengen von RT1B und RT1D als Expressionsvektoren im retroviralen Gentransfer verwendet

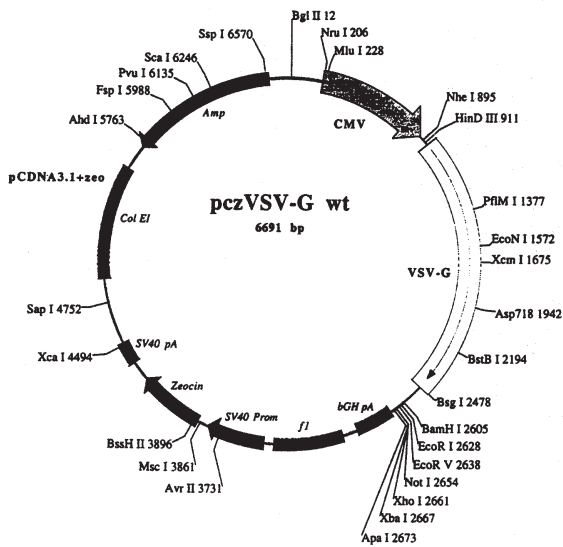


Fig. 29: Vektorkarte des pczVSV-G-Plasmids, enthält das für den retroviralen Gentransfer benötigte VSV-env-Gen

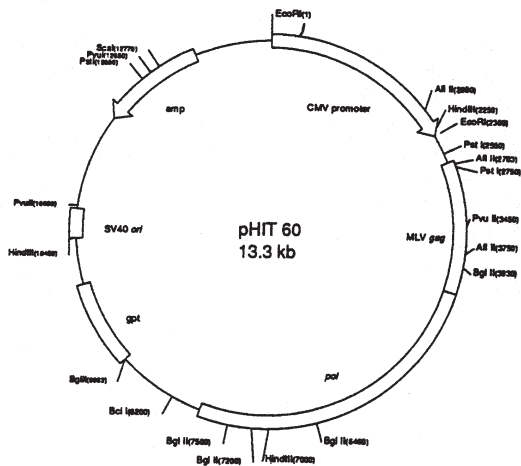


Fig. 30: Vektorkarte des pHIT60-Plasmids, enthält die ebenfalls für den retroviralen Gentransfer benötigten MoMLV-gag- und -pol-Gene

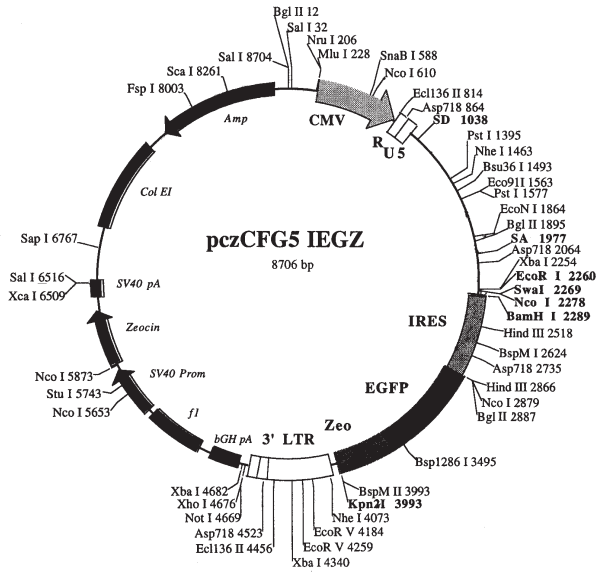


Fig.31:Vektorkarte des pczCFG5 IEGZ-Plasmids, das eine Zeomycinresistenz enthält und als Träger für das Maus-li-Gen verwendet wurde

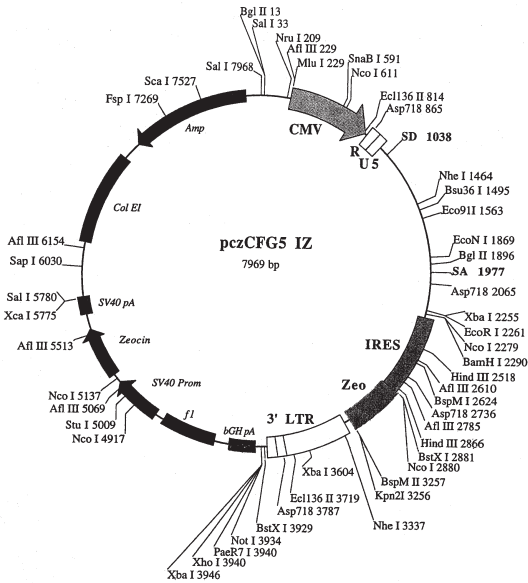


Fig.32:Vektorkarte des pczCFG5 IZ-Plasmids, dem im Unterschied zu pczCFG5 IEGZ das eGFP fehlt, ebenfalls verwendet als Träger für das Maus-li-Gen

8. Literaturverzeichnis

- Acha-Orbea H und MacDonald HR (1995); "Superantigens of mouse mammary tumor virus"; Annual Reviews in Immunology 13, 459-486
- Al-Daccak R, Mehindate K, Damdoumi F, Etongue-Mayer P, Nilsson H, Antonsson P, Sundstrom M, Dohlsten M, Sekaly RP und Mourad W (1998); Staphylococcal enterotoxin D is a promiscuous superantigen offering multiple modes of interactions with the MHC class II receptors"; J Immunology 160(1), 225-232
- Al-Lazikani B, Lesk AM und Chothia C (2000); "Canonical structures for the hypervariable regions of T cell $\alpha\beta$ receptors"; Journal of Molecular Biology 295(4), 979-995
- Anderson GD und David CS (1989); "In vivo expression and function of hybrid Ia dimers (E α A β) in recombinant and transgenic mice"; Journal of Experimental Medicine 170, 1003-1008
- Baccala R, Smith LR, Vestberg M, Peterson PA, Cole, BC und Theofilopoulos AN (1992); "Mycoplasma arthritidis mitogen, V β engaged in mice, rats, and humans, and requirement of HLA-DR α for presentation"; Arthritis Rheum. 35 (4), 434-442
- Bernal A, Proft T, Frase, JD und Posnett DN (1999); "Superantigens in human disease"; Journal of Clinical Immunology 19(3), 149-157
- Beutner U, Frankel WN, Cote MS, Coffin JM und Huber BT (1992); "Mls-1 is encoded by the long terminal repeat open reading frame of the mouse mammary tumor provirus mtv-7"; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 5432-5436
- Bhadra S, Lozano MM, Payne SM und Dudley JP (2006); "Endogenous MMTV Proviruses Induce Susceptibility to Both Viral and Bacterial Pathogens"; PLoS Pathogens, elektronische Veröffentlichung vor Druck
- Bueler H und Mulligan RC (1996); "Induction of antigen-specific 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), 545-555
- Cole BC und Atkin CL (1991); "The Mycoplasma arthritidis T-cell mitogen, MAM: a model superantigen"; Immunol Today 12(8), 271-276

- Cole BC, Knudtson KL, Oliphant A, Sawitzke AD, Pole A, Manohar M, Benson LS, Ahmed E und Atkin CL (1996); "The sequence of the *Mycoplasma arthritidis* superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens"; *J. Exp. Med.* 183(3), 1105-1110
- Dalwadi H, Wei B, Kronenberg M, Sutton CL und Braun J (2001); "The Crohn's disease-associated bacterial protein I2 is a novel enteric t cell superantigen"; *Immunity* 15(1),149-158
- Delcourt M, Thibodeau J, Denis DF und Sekaly R (1997); "Paracrine Transfer of Mouse Mammary Tumor Virus Superantigen"; *J. Exp. Med.* 185 (3), 471-480
- Diamond AG, Hood LE, Howard JC, Windle M und Winoto A (1989), "The class II genes of the rat MHC"; *Journal of Immunology* 142(9), 3268-3274.
- Dinges MM, Orwin PM und Schlievert PM (2000); "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*"; *Clinical Microbiology Reviews* 13, 16–34
- Donadini R, Liew CW, Kwan AHY, Mackay JP und Fields BA (2004); "Crystal and solution structures of a superantigen from *Yersinia pseudotuberculosis* reveal a jelly-roll fold"; *Structure* 12, 145-156
- Etongue-Mayer P, Langlois MA, Ouellette M, Li H, Younes S, Al-Daccak R und Mourad W (2002); "Involvement of zinc in the binding of *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen to the proximity of the HLA-DR binding groove regardless of histidine 81 of the β chain"; *Eur J Immunol.* 32(1), 50-58
- Festenstein H (1973); "Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allo transformation (MLR) in the mouse"; *Transplant Rev.* 15, 62-88
- Fleischer B und Schrezenmeier H (1988); "T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells"; *J. Exp. Med.* 167, 1697
- Fukui Y, Esaki Y, Kimura A, Hirokawa K, Nishimura Y und Sasazuki T (1993); "T-cell repertoire in a strain of transgenic C57BL/6 mice with the HLA-DRA gene on the X chromosome"; *Immunogenetics* 37(3), 204-211

- Gayama S, Doyon L, Vaupel B, Sekaly RP und Kanagawa O (1998); "Induction of endogenous mammary tumor virus in lymphocytes infected with murine acquired immunodeficiency syndrome virus"; *Cell Immunol.* 187(2), 124-130
- Germain RN, Bentley DM and Quill H (1985); "Influence of Allelic Polymorphism on the Assembly and Surface Expression of Class II MHC (Ia) Molecules"; *Cell*, Volume 43, 233-242
- Germain RN und Quill H (1986); "Unexpected transfection of a unique mixed-isotype class II MHC molecule by transfected L-cells"; *Nature* 320, 72-75
- Germain RN und Malissen B (1987); "Analysis of the expression and function of MHC class-II histocompatibility complex-encoded molecules by DNA-mediated gene-transfer"; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84 (22), 8065-8069
- Gilfillan S, Aiso S, Michie SA und McDevitt HO (1990); "The effect of β -chain synthesis on cell-surface expression of allele-mismatched class II heterodimers in vivo"; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 7314-7318
- Gold DP, Surh CD, Sellins KS, Schroder K, Sprent J und Wilson DB (1994); "Rat T cell responses to superantigens. II. Allelic differences in V β 8.2 and V β 8.5 β chains determine responsiveness to staphylococcal enterotoxin B and mouse mammary tumor virus-encoded products"; *J Exp Med.* 179(1), 63-69
- Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP und Ross SR (1992); "Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection"; *Cell* 69(4), 637-645
- Golovkina TV, Dudley JP und Ross SR (1998); "B and T cells are required for mouse mammary tumor virus spread within the mammary gland"; *Journal of Immunology* 161(5), 2375-2382
- Grigg M, McNahon CW, Morkowski S, Rudensky AY und Pullen AM (1998); "Mtv-1 Superantigen trafficks independently of Major Histocompatibility Complex Class II directly to the B-Cell surface by the exocytotic pathway"; *Journal of Virology*, 2577-2588
- Gunning P, Leavitt J, Muscat G, Ng SY und Kedes L (1987); "A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts"; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(14), 4831-4835.

- Herman A, Croteau G, Sekaly, RP, Kappler J und Murrack P (1990); "HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells"; *Journal of Experimental Medicine* 172(3), 709-717
- Herman A, Kappler JW, Murrack P und Pullen AM (1991); "Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses", *Annu Rev Immunol.* 9, 745-747
- Herrmann T, Accolla RS und MacDonald HR (1989); "Different staphylococcal enterotoxins bind preferentially to distinct major histocompatibility complex class II isotypes."; *Eur. J Immunology*, 19 (11), 2171-2174
- Herrmann T, Romero P, Sartoris S, Paiola F, Accolla RS, Maryanski JL und MacDonald HR (1991); "Staphylococcal enterotoxin-dependent lysis of MHC class II negative target cells by cytolytic T lymphocytes"; *J. Immunology* 146, 2504-2512
- Herrmann T, Hochgrebe T, Torres-Nagel NE, Huber BT und Hünig T (1994); "Control of the rat T cell response to retroviral and bacterial superantigens by class II MHC products and Tcrb-V8.2 alleles"; *Journal of Immunology* 152(9), 4300-4309
- Hodtsev AS, Choi Y, Spanopoulou E und Posnett DN (1998); "Mycoplasma superantigen is a CDR3-dependent ligand for the T cell antigen receptor"; *J Exp Med.* 187(3), 319-327
- Hoffmann ML, Jablonski LM, Crum KK, Hackett SP, Chi Y, Stauffacher CV, Stevens DL und Bohachi GA (1994); "Predictions of T-Cell Receptor- and Major Histocompatibility Complex-Binding Sites on Staphylococcal Enterotoxin C1"; *Infection and Immunity* 62 (8), 3396-3407
- Holm L und Sander C (1993); "Protein structure comparison by alignment of distance matrices"; *J Mol Biol.* 233 (1), 123-138
- Ito Y, Seprenyi G, Abe J und Kohsaka T (1999); "Analysis of functional regions of YPM, a superantigen derived from gram-negative bacteria"; *Eur J Biochem.* 263(2), 326-337
- Kaempfer R (2004); "Peptide antagonists of superantigen toxins"; *Molecular Diversity* 8, 113-120
- Karaüzüm H (2003); "Expression und funktionelle Analyse von Ratten MHC II-Molekülen"; *Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Fakultät für Biologie*

- Kreiss M, Asmuss A, Krejci K, Lindemann D, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, Rink L, Broeren CP und Herrmann T (2004); "Contrasting contributions of complementarity-determining region 2 and hypervariable region 4 of rat BV8S2⁺ (V β 8.2) TCR to the recognition of myelin basic protein and different types of bacterial superantigens"; *Int. Immunol.* 16(5), 655-63
- Langlois MA, El Fakhry Y und Mourad W (2003); "Zinc-binding sites in the N terminus of Mycoplasma arthritidis-derived mitogen permit the dimer formation required for high affinity binding to HLA-DR and for T cell activation"; *J Biol Chem.* 278(25), 22309-22315
- Lapatschek M, Durr S, Lower R, Magin C, Wagner H und Miethke T (2000); "Functional analysis of the env open reading frame in human endogenous retrovirus IDDMK(1,2)22 encoding superantigen activity"; *J Virol.* 74(14), 6386-6393.
- Layet C und Germain RN (1991); "Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A α A β dimers from the endoplasmatic reticulum/cis-golgi compartment"; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 2346-2350
- Lechler RI, Sant AJ, Braunstein NS, Sekaly R, Long E und Germain RN (1990); "Key influence of residues in the Amino-Terminal Portion of the β 1 Domain"; *Journal of Immunology* 144, 329-333
- Li H, Van Vranken S, Zhao Y, Li Z, Guo Y, Eisele L und Li Y(2005); "Crystal structures of T cell receptor (beta) chains related to rheumatoid arthritis"; *Protein Science* 14, 3025-3038
- Li PL, Tiedemann RE, Moffat SL und Fraser JD (1997); "The superantigen streptococcal pyrogenic exotoxin C (SPE-C) exhibits a novel mode of action"; *J Exp Med.*186(3), 375-383
- Li Y, Li H, Dimasi N, McCormick JK, Martin R, Schuck P, Schlievert PM und Mariuzza RA (2001); "Crystal structure of a superantigen bound to the high-affinity, zinc-dependent site on MHC class II", *Immunity* 14(1), 93-104
- Lotteau V, Teyton L, Burroughs D und Charron D (1987); "A novel HLA class II molecule (DR α -DQ β) created by mismatched isotype pairing"; *Letters to Nature* 329, 339-341

- Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC und Askonas BA (1989); "Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro"; *Journal of Experimental Medicine* 169(4), 1255-1264
- Maeda K, Sato T, Azuma M, Yagita H und Okumura K (1997); "Characterization of rat CD80 and CD86 by molecular cloning and mAb"; *Int. Immunology* 9, 993-1000
- Malchiodi EL, Eisenstein E, Fields BA, Ohlendorf DH, Schlievert PM, Karjalainen K und Mariuzza RA (1995); "Superantigen binding to a T cell receptor β chain of known three-dimensional structure"; *J Exp Med.* 182(6), 1833-1845.
- Malissen B, Peele-Price M, Goverman JM, McMillan M, White J, Kappler J, Marrack P, Pierres F, LPierres M und Hood L (1984); "Gene transfer of H2 class II genes; Antigen presentation by mouse fibroblast and hamster B cell lines"; *Cell* 36, 319
- Malissen B, Shastri N, Pierres M und Hood L (1986); "Cotransfer of the E^d- α and A^d- β genes into L cells results in the surface expression of a functional mixed-isotype Ia molecule"; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83, 3958-3962
- Mathis DJ, Benoist CO, Williams VE 2nd, Kanter MR und McDevitt HO (1983); "The murine E α immune response gene."; *Cell* 32(3), 745-754
- Matsunaga M, Seki K, Mineta T und Kimoto M (1990); "Antigen-reactive T cell clones restricted by A^d β /E^d α class II molecules"; *Journal of Experimental Medicine* 171, 577-582
- McNicholas J, Steinmetz M, Hunkapiller T, Jones P und Hood L (1982); "DNA sequence of the gene encoding the E α Ia polypeptide of the BALB/c mouse"; *Science* 218 (4578), 1229-1232
- Miller J und Germain RN (1986); "Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of the invariant chain"; *Journal of Experimental Medicine* 164, 1478-1489
- Miyoshi-Akiyama T, Imanishi K und Uchiyama T (1993); "Purification and partial characterization of a product from *Yersinia pseudotuberculosis* with the ability to activate human T cells"; *Infect Immun.* 61(9), 3922-3927

- Nicolas JF, Wegmann D, Lebrun P, Kaiserlian D, Tovey J und Glasebrook AL (1987); "Relationship of B cell Fc receptors to T cell recognition of MIs antigen"; Eur J Immunol. 17(11), 1561-1565
- Norcross MA, Raghupathy R, Strominger J und Germain RN (1986); "Transfected human B lymphoblastoid cells express the mouse A β -chain in association with DR α "; Journal of Immunology 137(5), 1714-1717
- Petersson K, Hakansson M, Nilsson H, Forsberg G, Svensson LA, Liljas A und Walse B (2001); "Crystal structure of a superantigen bound to MHC class II displays zinc and peptide dependence"; EMBO J. 20(13), 3306-3312
- Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R und Ross SR (2002); "Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4"; Proc Natl Acad Sci U S A, 99(4), 2281-2286
- Reilly M, Mix D, Reilly AA, Ye XY und Winslow GM (2000); "Intercellular Transfer of a Soluble Viral Superantigen"; Journal of Virology 74 (1), 8262-8267
- Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu J, Xiong Y, Hussey RE, Smolyar A, Hare B, Zhang R, Joachimiak A, Chang HC, Wagner G und Wang J (1999); "The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II"; Science 286(5446), 1913-1921
- Rogers TJ, Guan L und Zhang L (1995); "Characterization of an alternative superantigen binding site expressed on a renal fibroblast cell line"; Int. Immunology 7(11), 1721-1727
- Rogers TJ und Zhang L (1997); "Structural basis for the interaction of superantigen with the alternative superantigen-binding receptor p85"; Mol. Immunology 34 (3); 263-272
- Roussel A, Anderson BF, Baker HM, Fraser JD und Baker EN (1997); "Crystal structure of the streptococcal superantigen SPE-C: dimerization and zinc binding suggest a novel mode of interaction with MHC class II molecules"; Nat Struct Biol. 4(8), 635-643
- Sant AJ und Germain RN (1989); "Intracellular competition for component chains determines class II MHC cell surface phenotypes"; Cell 57, 797-805

- Scheuber PH, Denzlinger C, Wilker D, Beck G, Keppler D und Hammer DK (1987); Staphylococcal enterotoxin B as a nonimmunological mast cell stimulus in primates: The role of endogenous cysteinyl leukotrienes"; *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82, 289-291
- Sellins KS, Bellgrau D und Gold DP (1992); "Specificity of rat T cell receptor V β chain usage in proliferative responses to staphylococcal enterotoxin B"; *Eur J Immunol.* 22(7), 1931-1934.
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM und Kingsman AJ (1995); "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors"; *Nucleic Acids Res.* 23(4), 628-633
- Soos JM, Mujtaba MG, Schiffenbauer J, Torres BA und Johnson HM (2002); Intramolecular epitope spreading induced by staphylococcal enterotoxin superantigen reactivation of experimental allergic encephalomyelitis"; *J Neuroimmunol.* 123(1-2), 30-34
- Spencer JS und Kubo RT (1989); "Mixed isotype class II antigen expression. A novel class II molecule is expressed on a murine B cell lymphoma"; *Journal of Experimental Medicine* 169, 625-640
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber, BT, Pelet T und Conrad B (2001); "Interferon- α -induced endogenous superantigen: A model linking environment and autoimmunity"; *Immunity* 15, 591-601
- Subramanyam M, McLellan B, Labrecque N, Sekaly RP und Huber BT (1993); "Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells"; *Journal of Immunology* 151, 2538-2545
- Sun R, Shepherd SE, Geier SS, Thomson CT, Sheil JM und Nathenson SG (1995); "Evidence that the antigen receptors of cytotoxic T lymphocytes interact with a common recognition pattern on the H-2Kb molecule"; *Immunity* 3(5), 573-582.
- Sundberg EJ, Li Y und Mariuzza RA (2002); "So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signaling complexes"; *Current Opinion in Immunology* 14, 36-44

- Sundström M, Abrahmsen L, Antonsson P, Mehindate K, Mourad W und Dohlsten M (1996); “The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn²⁺-mediated homodimerization”; *EMBO J.* 15(24), 6832-6840
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA und Huber BT (2001); “Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen”; *Immunity* 15, 579-589
- Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC und Johnson HM (2001); “Superantigens: The Good, the Bad and the Ugly”; *Experimental Biology and Medicine* 226, 164-176
- Vath GM, Earhart CA, Rago JV, Kim MH, Bohach GA, Schlievert PM und Ohlendorf DH (1997); “The structure of the superantigen exfoliative toxin A suggests a novel regulation as a serine protease”; *Biochemistry.* 36(7), 1559-1566
- Vath GM, Earhart CA, Monie DD, Iandolo JJ, Schlievert PM und Ohlendorf DH (1999); “The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity”; *Biochemistry* 38(32), 10239-10246
- Wang L, Zhao Y, Li Z, Guo Y, Jones LL, Kranz DM, Mourad W und Li H (2007); “Crystal structure of a complete ternary complex of TCR, superantigen and peptide-MHC”; *Nature structural & molecular biology* 14(2), 169-171
- Wen R, Broussard DR, Surman S, Hogg TL, Blackman MA und Woodland DL (1997); “Carboxy-terminal residues of major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of the bacterial superantigen toxic shock syndrome toxin-1 to T cells”; *Eur J Immunol.* 27(3), 772-781
- Woodland DL, Wen R und Blackman MA (1997); “Why do superantigens care about peptides?”; *Immunol Today* 18(1), 18-22
- Yee JK, Friedmann T und Burns JC; “Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range”; *Methods Cell Biol.* 43 Pt A, 99-112
- Zhao Y, Li Z, Drozd SJ, GuoY, Mourad W und Li H (2004); “Crystal structure of mycoplasma arthritis mitogen complexed with HLA-DR1 reveals a novel superantigen fold and a dimerized superantigen-MHC complex”; *Structure* 12, 277-288

Zinkernagel RM und Doherty PC (1979); "MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness"; *Advanced Immunology* 27, 51-177

9. Abkürzungen

(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP/CTP/GTP/TTP	Adenosin-/Cytidin-/Guanosin-/Thymidin-Triphosphat
ATV	Adjusted-Trypsin-Versen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	Balanced salt solution
BZR	B-Zellrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity determining region
CLIP	Class II associated invariant chain peptide
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
d	Tag
D	Dalton
DaMIg	Donkey anti-mouse immunoglobulin
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(complementary) Deoxyribonucleic acid
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
env	Envelope proteins (retrovirus)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	Framework region
g	Gramm bzw. Fallbeschleunigung
gag	Gruppenspezifisches Antigen (Retrovirus)
gfp	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Hour
HBS	HEPES buffered saline
HERV	Humanes endogenes Retrovirus

HLA	Human leukocyte antigen
HV	Hypervariable Region
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
INF	Interferon
l	Liter
LEW	LEWIS/Crl-Rattenstamm
LFA	Leukocyte functional antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	Long terminal repeat
M	Mol
MAIDS	Mouse acquired immunodeficiency syndrome
MAS	Mycoplasma arthritidis Superantigen
(gp)MBP	(guinea pig) myelin basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
MIIC	MHC class II compartment
min	Minute
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MoMLV	Moloney-Murines-Leukämie-Virus
MS	Multiple Sklerose
mtv	Mammary tumor virus
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nMIg	Normales Maus-Immunglobulin
(d(d))NTP	((di)desoxy) Nukleosidtriphosphate
orf	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered salines
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbolmyristataacetat
pol	Polymerase (Retrovirus)
PP	Polypropylen
rER	Raues endoplasmatisches Retikulum
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR

s	Sekunde
Sag	Superantigen
SaMIg	Schaf-anti-Maus-Immunglobulin
SC	Serum complement
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Spe	Streptokokken-Pyrogenes-Exotoxin
SU	Surface unit
TBLV	Type B leukemogenic virus
TEMED	Tetramethylendiamin
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TSST	Toxisches-Schocksyndrom-Toxin
TZ	T-Zelle
TZH	T-Zellhybridom
TZR	T-Zellrezeptor
U	Unit
vSag7	Virales Superantigen des Provirus mtv7
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
YPM	Yersinia pseudotuberculosis Mitogen

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Herrmann, die mir durch ihre stets hilfsbereite Art eine große Unterstützung gewesen sind und die für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Besonders Ingrid, Elwira und Kathrin haben mir in der Einarbeitungsphase mit viel persönlichem Einsatz zur Seite gestanden und dadurch vieles erleichtert, ebenso waren mir Stefan und Bladimiro stets eine wertvolle Hilfe.

Prof. Dr. Thomas Herrmann danke ich herzlich für die Betreuung. Die Gespräche mit ihm haben mir viele neue Perspektiven eröffnet und für die Herangehensweise an Problemstellungen sehr geholfen.

Ebenso gilt mein Dank allen Menschen, die mich neben der eigentlichen Arbeit persönlich unterstützt haben: Zuallererst natürlich meiner Familie und meiner Freundin Kati, aber ebenso Steffen Bernard und Roland Eckert für ihr Verständnis und Toleranz in Wohnungsangelegenheiten und Christoffer Krug für seine Freundschaft, sowie vielen anderen, die ich hier nicht alle namentlich erwähnen kann.

LEBENS LAUF

Persönliche Informationen

Henry Dlaske
Geburtsdatum: 02.11.1979
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Anschrift: Höchberger Str. 24
97082 Würzburg

Beruflicher Werdegang

Seit 08/2007 Assistenzarzt der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg
05/2007 Approbation als Arzt

Studium

04/2007 3. Staatsexamen, Note „sehr gut“
04/2006 2. Staatsexamen, Note „sehr gut“
08/2003 1. Staatsexamen, Note „sehr gut“
08/2002 Physikum Note „sehr gut“
seit 10/2000 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität,
Würzburg

Praktisches Jahr

12/2006 – 03/2007 Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie und Gastroenterologie,
Juliussspital Würzburg
08/2006 – 12/2006 Chirurgie, Abteilung für Gastroenterochirurgie, Urologie und
Neurochirurgie, Universitätsklinik Turku, Finnland
04/2006 – 08/2006 Neurologie, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Köln

Famulaturen


09/2005 Praxis für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Linz am Rhein
03/2005 Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie, Zentralfinnisches
Krankenhaus in Jyväskylä, Finnland
09/2003 – 10/2003 Immunologie, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
02/2003 – 03/2003 Allgemein- und Unfallchirurgie, Franziskus-Krankenhaus Linz

Zivildienst

09/1999- 07/2000 Caritas Sozialstation Linz (am Rhein)

Schulbildung

1992-1999 Martinus-Gymnasium-Linz, Abschluss Allgemeine Hochschulreife
1986-1992 Polytechnische Oberschule Wilhelm Guddorf, Berlin

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'G. Guddorf', written in a cursive style.

Würzburg, d. 04.02.2008