

**T-ZELLREZEPTORBINDUNG UND MODULATION
DER T-ZELLAKTIVIERUNG
DURCH AUTOANTIGENE DER RATTE**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
DOKTORWÜRDE DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG

EINGEREICHT VON:
MATTHIAS KREIB
AUS WÜRZBURG

WÜRZBURG, IM MAI 2004

ERKLÄRUNG:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbst angefertigt zu haben.
Es wurden keine Quellen und Hilfsmittel, außer den angegebenen, verwendet.

Diese Arbeit hat weder in gleicher, noch in ähnlicher Form in einem anderen
Prüfungsverfahren vorgelegen.

Bis jetzt habe ich keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 11.5. 2004

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex	5
1.2.1. Die Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplex	6
1.2.2. Der RT1B-Komplex	8
1.2.3. HLA-DM und die invariante Kette	10
1.2.4. Die Reifung von MHC Klasse II Molekülen	11
1.3. Autoimmunität und die Rolle des MHC	12
1.4. Die Interaktion von TCR, MHC und Peptid	14
1.5. Autoantigen- und Superantigenbindung an MHC Klasse II	16
1.6. $\gamma\delta$ -T-Zellen	18
1.6.1. Antigene für V γ 9V δ 2 T-Zellen	20
1.7. Zielsetzung	26
2. Material	27
2.1. Lösungen, Puffer und Nährmedien	28
2.2. Enzyme und Inhibitoren	31
2.3. Reagenzkits	32
2.4. Monoklonale Antikörper	32
2.5. Sonstige serologische Reagentien	32
2.6. Nukleinsäuren und Oligonukleotide	33
2.6.1. Primer für PCR und Sequenzierung	32
2.7. Zellen	35
2.8. Bakterienstämme	37
2.9. Vektoren	37
2.10. Molekulargewicht-Marker (DNA-Marker)	39
2.11. Proteinmarker	39
2.12. Peptide	39

3.	Methoden	40
3.1.	Zellbiologische Methoden	40
3.1.1.	Arbeiten mit Bakterien	40
3.1.1.1.	Übernachtkultur	40
3.1.1.2.	Dauerkultur	40
3.1.2.	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	41
3.1.2.1.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
3.1.2.2.	Kultivierung von Zellen	41
3.1.2.3.	Immunfluoreszenzen und Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	42
3.1.2.4.	Anreicherung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACSsort)	44
3.1.2.5.	Anreicherung durch MACS-Sort	44
3.1.2.6.	Einzellzellklonierung durch Grenzverdünnung („limiting dilution“)	45
3.2.	Molekularbiologische Methoden	45
3.2.1.	Gelelektrophorese	45
3.2.2.	Elution von DNA aus Agarosegelen	46
3.2.3.	Restriktionsenzym-Reaktion	46
3.2.4.	Isolation von Gesamt-RNA	47
3.2.5.	Isolation von Plasmid-DNA	48
3.2.5.1.	Großpräparation mit Hilfe des Quiagen-Maxi-Kit	48
3.2.5.2.	Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab über Promegasäulen	48
3.2.6.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	49
3.2.6.1.	Standard-PCR mit doppelsträngiger (ds) DNA	49
3.2.6.2.	RT-PCR	50
3.2.6.3.	Reinigung von PCR-Produkten	51
3.2.7.	Klonierungen	52
3.2.7.1.	Vorbereiten des Vektors	52
3.2.7.2.	Vorbereiten des Inserts	52
3.2.7.3.	Ligation	53
3.2.7.4.	Transformation	53
3.2.7.5.	Subklonierung mit Hilfe des TOPO-Kits	53
3.2.7.6.	Umklonieren in den viralen Expressionsvektor SFG	54

3.2.7.8.	Kovalentes Binden von MBP ₇₁₋₉₀ an die β -Kette von RT1B ¹	55
3.2.7.9.	Generierung des RT1B ¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts	55
3.2.7.10.	Generierung von RT1B ¹ „Singlechain-Molekülen“	56
3.2.8.	Sequenzieren von DNA	56
3.2.9.	Gerichtete Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR	57
3.2.10.	Transduktion von Genen in eukaryotische Zellen durch virale Vektoren (Transfektion)	59
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	63
3.3.1.	Rekombinante Proteinexpression in Prokaryoten	63
3.3.1.1.	Proteinexpression über den T7-Promotor und das pET-Vektorsystem	63
3.3.2.	Proteininduktion durch IPTG	63
3.3.3.	Reinigung von „Inclusion Bodies“	64
3.3.4.	Ionen-Austausch-Chromatographie mittels FPLC	64
3.3.5.	Dialyse	64
3.3.6.	Gelfiltration	65
3.3.7.	Konzentrierung von Proteinen	65
3.3.8.	Proteinbestimmung von Proteinen nach Bradford	65
3.3.9.	ELISA	66
3.3.10.	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	67
3.3.11.	Biotinylierung von Proteinen	67
3.3.12.	MHC Klasse II- Peptid-Bindungs-Assay	68
3.3.13.	Western-Blot Analysen, Chemoluminiszenznachweis	68
3.3.14.	Antikörper vermittelter Nachweis von Proteinen im Western-Blot	69
3.3.15.	Herstellung von Zellysaten	69

4. Ergebnisse 70

4.1.	Expression von funktionellem RT1B ¹ über ein retrovirales Vektorsystem	71
4.1.1.	Expression von rekombinantem RT1B ¹ auf der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien	75
4.1.2.	Funktionelle Charakterisierung von RT1B ¹ als Restriktionselement	76

4.2.	Untersuchungen einer neuen RT1B ¹ α -Ketten Variante (V38M)_____	79
	hinsichtlich Oberflächenexpression und Funktionalität	
4.2.1.	Die Mutation V38M der α -Kette von RT1B ¹ führt zu einer stark_____	81
	attenuierten Funktionalität	
4.2.2.	Durch kovalente Binden von MBP an die RT1B ¹ β -Kette kann die _____	82
	Funktionalität der RT1B ¹ α V38M Variante wiederhergestellt werden	
4.2.3.	Expression der RT1B ¹ α V38M Variante mit RT1B ¹ MBP ₇₁₋₉₀ Peptid_____	83
4.2.3.	Funktionelle Charakterisierung der RT1B ¹ α V38M Variante mit_____	85
	kovalentem MBP ₇₁₋₉₀ Peptid	
4.3.	Effekte von RT1B ¹ exprimierenden murinen Mastozytomazellen_____	86
	in der AT-EAE	
4.3.1.	P80 Zellen für <i>in vivo</i> Versuche exprimieren RT1B ¹ mit und ohne_____	87
	kovalentes MBP ₇₁₋₉₀ Peptid	
4.3.2.	Effekte der transgenen MHC Klasse II-CD80 positiven Zellen_____	88
	auf den Krankheitsverlauf einer AT-EAE	
4.4.	Generierung neuartiger RT1B ¹ Peptid „Singlechain“ Moleküle_____	90
4.5.	Antigenbindung eines löslichen β 1 α 1-Domänen Konstrukts_____	95
	von RT1B ¹ und Modulation der T-Zellaktivierung	
4.5.1.	Generierung des RT1B ¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts_____	96
4.5.2.	Reinigung des RT1B ¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts_____	96
4.5.3.	Das RT1B ¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts bindet im MHC-Peptid-Assay____	102
	spezifisch MBP	
4.6.	Einsatz RT1B ¹ und CD28 transduzierter Zelllinien zur Untersuchung_____	104
	des Beitrags der CDRs zur Super- und Antigenpezifität von RT1B ¹ restringierten BV8S2 ⁺ Zellen in der LEW-Ratte	
4.6.1.	Funktionelle Expression des gpMBP spezifischen T-Zellrezeptors_____	104
	35/1 und seines Restriktionselements RT1B ¹	
4.6.2.	Beitrag der CDR2 und CDR4/HV4 zur Reaktivität der Antigen- und_____	107
	Superantigenerkennung des T-Zellrezeptors des Hybridoms 35/1	
4.7.	Einsatz von RT1B ¹ und CD28 exprimierenden Zelllinien zur_____	111
	Etablierung eines kalibrierten Zellsystems zur Untersuchung $\gamma\delta$ T-zell-aktivierender Substanzen	
4.7.1.	Expression eines humanem V γ ₉ /V δ ₂ -TCR_____	113

4.7.2.	Expression des humanen V γ_9 /V δ_2 TCR auf der Zelloberfläche _____	113
	TCR -/- Mauseellen (BW58C)	
4.7.3.	Die Erkennung von Liganden des mit humanen V γ_9 /V δ_2 TCR _____	115
	transduzierten Maus T- Zellhybridoms (BW58C) ist CD28 abhängig	
4.7.4.	Das mit humanen V γ_9 /V δ_2 TCR und Maus /Ratten CD28 _____	116
	transduzierte Maus T- Zellhybridom (BW58C) sezerniert	
	nach Zoledronat Stimulation IL-2 nur in Gegenwart humaner B-Zellen	
4.7.5.	Generierung eines „kalibrierten“ Systems zur Analyse _____	117
	der Antigenpräsentation humaner V γ_9 /V δ_2 T-Zellrezeptoren	
5.	Diskussion _____	118
5.1.	Expression von RT1B ¹ und Charakterisierung der Funktionalität _____	119
5.2.	Untersuchungen einer neuen RT1B ¹ α -Ketten Variante (V38M) _____	120
	hinsichtlich Oberflächenexpression und Funktionalität	
5.3.	Effekte von RT1B ¹ exprimierenden murinen Mastozytomazellen _____	122
	in der aktiven und AT-EAE	
5.4.	Generierung neuartiger RT1B ¹ „Singlechain“ Konstrukte _____	125
5.5.	Einsatz RT1B ¹ und CD28 transduzierter Zelllinien zur Untersuchung _____	129
	des Beitrags der CDRs zur Super- und Antigenpezifität von	
	RT1B ¹ restringierten BV8S2 ⁺ Zellen in der LEW-Ratte	
5.6.	Einsatz von RT1B ¹ und CD28 exprimierenden Zelllinien _____	133
	zur Etablierung eines kalibrierten Zellsystems zur Untersuchung	
	$\gamma\delta$ T-zell-aktivierender Substanzen	
6.	Zusammenfassung _____	138
7.	Abstract _____	140
8.	Literaturverzeichnis _____	142
9.	Vektorkarten _____	166
10.	Abkürzungen _____	171

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

Nach der Theorie der klonalen Selektion, die von Sir Macfarlane Burnet formuliert wurde, gehen bei Vertebraten die adaptiven, antigenspezifischen Antworten des Immunsystems von Lymphozyten aus. Diese lassen sich in B- und T-Zellen gliedern. Zellen beider Populationen besitzen an ihrer Oberfläche Antigenrezeptoren. Anhand dieser Oberflächenmoleküle, die hoch variabel gestaltet sind, sind die Zellen in der Lage enorm viele Pathogene zu erkennen.

Der an der Zelloberfläche exprimierte Antigenrezeptor besitzt bei jedem Lymphozyt eine einzigartige Spezifität. Beim ersten Kontakt mit einem Antigen werden die anfänglich noch wenigen Zellen mit dem zum Antigen passenden Rezeptor aktiviert und proliferieren.

Bei diesem Vorgang differenzieren sie in spezielle Effektor- und Gedächtniszellen aus. Effektorzellen wirken spezifisch gegen ein Pathogen und sterben dann, während die langlebigen Gedächtniszellen bei einem zweiten Kontakt mit demselben Erreger sofort eine starke spezifische Immunantwort hervorrufen (Coico et al., 1983).

Die extreme Vielfalt der Rezeptoren wird durch die auf Lymphozyten beschränkte somatische Rekombination generiert. Aufgebaut ist ein Antigenrezeptor aus verschiedenen Molekülen, im Fall des T-Zellrezeptors aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Diese Heterodimere können entweder aus einem $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ Kettenpaar gebildet werden. Dabei stellen die $\gamma\delta$ Heterodimere eine Minderheit mit speziellen Funktionen dar, auf die später näher eingegangen wird. Beide Ketten des Heterodimers eines TCR besitzen einen aminoterminalen variablen Bereich (V-Domäne), einen konstanten Bereich (C-Domäne) und eine kurze Gelenkregion, die einen Cysteinrest enthält, der die Disulfidbrücke zwischen den Polypeptidketten bildet. Jede Kette durchspannt die Lipiddoppelschicht mit einer hydrophoben Transmembrandomäne und endet in der Zelle mit einem kurzen zytoplasmatischen Bereich. B-Zellrezeptoren (BCR) werden aus sogenannten schweren und leichten Ketten aufgebaut. Je ein Paar aus schwerer und leichter Kette bildet die Antigenbindungsstelle. Durch die Rekombination einer Vielzahl möglicher Gensegmente (bei der schweren Kette V-, D- und J-, bei der leichten V- und J-Segmente) wird der antigenspezifische Bereich gebildet. An den Verknüpfungspunkten der einzelnen Segmente

wird durch Verlust einzelner Nukleotide oder durch Insertion zusätzlicher P- und N-Nukleotide zudem Variabilität erzeugt. P-Nukleotide werden durch Haarnadelstrukturen gebildet, N-Nukleotide werden zufällig durch das Enzym TdT eingefügt (Weigert et al., 1978).

Außerdem sorgen bei Lymphozyten Leserastervariationen und Punktmutationen sowie zusätzlich somatische Mutationen bei Immunglobulinen für weitere Vielfalt der Rezeptoren (Hozumi und Tonegawa, 1976).

B-Zellen erkennen über ihre Oberflächenrezeptoren Proteine, Kohlenhydrate und Nucleinsäuren. Eine Aktivierung von B-Zellen erfolgt durch spezifische Antigenbindung und gleichzeitigem Kontakt mit von T-Zellen sezernierten Molekülen.

Nach der Aktivierung bilden B-Zellen spezielle nicht membrangebundene Antigenrezeptoren, sogenannte Antikörper. Diese sind, ebenso wie der B-Zellrezeptor und Ig-Bindungsstellen mancher Ig-Typen, bivalent, können also zwei Antigenmoleküle gleichzeitig binden. Ebenso gibt es decavalente Ig-Typen, wie IgM.

T-Zellen, die andere große Gruppe der Lymphozyten, tragen ebenfalls wichtige Funktionen bei der adaptiven Immunität, da sie ebenfalls, wie die B-Zellen, auf vielfältige Weise mit dem unspezifischen Immunsystem verbunden sind.

Sie produzieren zum Beispiel aktivierende Cytokine und chemotaktische Faktoren für verschiedene Zellgruppen.

Früher wurden T-Zellen als Zellen definiert, deren Vorläufer aus dem Knochenmark in den Thymus wandern, um dort zu reifen. Heute versteht man darunter eine Zellgruppe, die einen T-Zellrezeptor (TCR) exprimiert. Diese Definition basiert auf der Tatsache, daß obwohl der größte Teil des T-Zellrepertoires im Thymus generiert wird, einige T-Zellen extrathymisch reifen. T-Zellrezeptoren sind im Gegensatz zu Antikörpermolekülen monovalent, können also jeweils nur ein Antigenmolekül binden.

Anhand der TCR lassen sich 2 Klassen von T-Zellen unterscheiden. Die eine Klasse exprimiert den α/β TCR, die andere den γ/δ TCR.

Die bis heute vorliegenden Erkenntnisse über die Aufgaben und Funktionen von T-Zellen im Immunsystem stammen vorwiegend von α/β T-Zellen.

Die α/β T-Zellen erkennen generell als Antigene Peptide, die ihnen von speziellen antigenpräsentierenden Zellen an deren Zelloberfläche gezeigt werden. Zu den antigenpräsentierenden Zellen zählt man B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen. Die

Präsentationsmoleküle sind Proteine, die von Klasse I- und Klasse II-Genen des MHC-Komplexes kodiert werden (als MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle bezeichnet).

Über MHC Klasse I werden vor allem Fragmente von cytoplasmatischen Proteinen präsentiert. MHC Klasse II assoziierte Peptide stammen in der Regel von phagozytierten Proteinen, also von außerhalb der präsentierenden Zelle.

Beide MHC-Klassen werden auf zwei verschiedenen Prozessierungswegen durch spezielle zelluläre Apparate mit Peptiden beladen und an der Oberfläche exprimiert. α/β T-Zellen, die den Korezeptor CD4 exprimieren, erkennen normalerweise Peptide nur auf MHC-Klasse II Molekülen. CD8 als Korezeptor exprimierende α/β T-Zellen erkennen ihr Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse I.

Die genannten Korezeptoren senden nach der Bindung an MHC Moleküle stimulatorische Signale für die Aktivierung der T-Zelle aus. Zusätzlich erhöhen sie die Avidität der T-Zelle zum präsentierten Antigen.

Wenn eine α/β T-Zelle aktiviert wird, erhält sie Signale vom TCR, der sein antigenes Peptid auf dem MHC einer anderen Zelle erkennt und zusätzliche Signale vom Korezeptor. Erfolgt die Aktivierung zum erstenmal, werden weitere kostimulatorische Signale benötigt.

Diese können sowohl über Moleküle wie CD28, als auch über die Bindung von Lymphokinen (z.B. IL-2) an die Rezeptoren vermittelt werden.

Mittlerweile sind eine Reihe weiterer kostimulatorische Moleküle, wie ICOS oder PD-1 bekannt, und der Vorgang der T-Zellaktivierung zeigt sich immer komplexer geregelt (Sharpe und Freeman, 2002).

Signale, die denen der Aktivierung ähneln, spielen auch bei der Reifung im Thymuscortex eine wichtige Rolle. Die meisten T-Zellen reifen in diesem speziellen Milieu, wo zunächst die Rekombination der TCR-Gene stattfindet und anschließend Selektionsvorgänge, die die MHC-Restriktion der T-Zellen bestimmen. Unter MHC-Restriktion versteht man die Notwendigkeit der Antigenpräsentation durch körpereigene MHC-Molekülen, um T-Zellen zu stimulieren. Die T-Zell-Entwicklung umfaßt zwei Arten der Selektion: die positive auf Selbst MHC-Erkennung und die negative auf die Erkennung von Selbst-Peptid:Selbst-MHC-Komplexen. Der erste Vorgang wird vor allem durch Epithelzellen des Thymus vermittelt, der zweite durch dendritische Zellen und Makrophagen. Die positive Selektion stellt sicher, daß alle reifen T-Zellen auf Fremdartigene antworten können, die von Selbst-MHC-Molekülen

auf antigenpräsentierenden Zellen vorgezeigt werden. Die negative Selektion hingegen eliminiert hingegen autoreaktive Zellen.

Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Proliferation und Differenzierung ihrer Nachkommen in bewaffnete Effektorzellen.

Diese Vorgänge sind von der Produktion des T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 und dessen Bindung an einen hochaffinen Rezeptor auf der aktivierten T-Zelle abhängig. T-Zellen, deren Rezeptoren ihre Liganden ohne gleichzeitige kostimulatorische Signale binden, produzieren kein IL-2. Sie werden statt dessen anergisch. Diese beiden Vorbedingungen, Rezeptorbindung und Kostimulation, sorgen dafür, daß naive T-Zellen nicht auf Antigene auf eigenen Geweben reagieren.

Proliferierende T-Zellen entwickeln sich zu bewaffneten T-Effektorzellen, ein entscheidendes Ereignis bei adaptiven Immunantworten. Wenn ein expandierter Klon von T-Zellen einmal die Effektorfunktion erreicht hat, können seine Nachkommen auf jede Zielzelle reagieren, die Antigene an ihrer Oberfläche trägt. T-Effektorzellen können eine Vielzahl von Funktionen ausüben, wobei man verschiedene Gruppen unterscheidet:

Die Th1-Helferzellen genannten inflammatorischen CD4-T-Zellen aktivieren Makrophagen. Dies ist besonders wichtig bei Infektion mit intrazellulären Erregern (z.B. *Listeria*, *Toxoplasma* und *Leishmania*) (Stout und Bottomly, 1989).

CD4-T-Helferzellen, sogenannte Th2-Helferzellen, sezernieren B-Zell-aktivierende Zytokine. Diese Reaktion ist besonders bei extrazellulär lebenden Pathogenen wichtig (z.B. *Staphylococcus*).

CD8-T-Zellen sind eine andere T-Effektorzellpopulation. CD8-T-Zellen sezernieren sogenannte Zytotoxine (z.B. Perforin, Granzym und FasLigand) und Zytokine (z.B. IFN γ und TNF- β). Diese können Zellen lysieren, Apoptose induzieren oder Entzündungsreaktionen verstärken (Arai et al., 1990). Der Funktion, infizierte Zellen direkt zu vernichten, kommt eine enorme Bedeutung zu. Sie bietet einen effektiven Schutz vor intrazellulären Pathogenen, zum Beispiel Viren, weil sie infizierte Zellen vor der Vermehrung des Erregers töten können (die Abstoßung von Transplantaten ist ein medizinisch relevantes Problem dieser T-Zellfunktion)(Kuppers und Henney, 1977).

Die $\gamma\delta$ T-Zellen, als zweite wichtige T-Zellpopulation, werden in einem späteren Kapitel beschrieben.

1.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der sogenannte MHC (*Major Histocompatibility Complex*) ist polygen und umfasst eine Region von hochpolymorphen Genen und wurde ca. in der Mitte des letzten Jahrhunderts von Gorer und Snell bei Transplantationsexperimenten an Mausinzuchtstämmen entdeckt und charakterisiert. Tatsächlich sind die Gene des MHC die höchst polymorphen bekannten Gene überhaupt. Die Proteine, die von den MHC Genen kodiert werden, werden als Zelloberflächen-Glykoproteine exprimiert und als MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Moleküle oder MHC Antigene bezeichnet, da eine immunologische Reaktion gegen diese Proteine zur Transplantatabstoßung führt. Diese Transplantatabstoßung ist aber nicht die eigentliche physiologische Funktion der MHC Moleküle. Die Hauptbedeutung des MHC wurde bei Immunreaktionen erst ca. 20 Jahre später erkannt. Bei der Immunisierung von Inzuchtstämmen fanden Benacerraf und McDevitt mit einem einfachen Polypeptid, dass einige der Tiere Antikörper produzierten, bei anderen hingegen keine Immunreaktion vorhanden war. Diese Eigenschaft wurde autosomal dominant vererbt und konnte innerhalb des MHC Genlocus definiert werden. In den späten 70er Jahren wurde deutlich, dass der MHC eine wichtige Kontrollfunktion bei der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten einnimmt. Dieses Prinzip wurde als „MHC-Restriktion“ bezeichnet und beinhaltet eine Erkennung von Komplexen aus Fremdpeptiden und autologen MHC Molekülen durch den T-Zellrezeptor von T-Lymphozyten (Zinkernagel und Doherty, 1979).

Der MHC besitzt bei allen bisher untersuchten Säugetierspezies in Bezug auf die genetische Organisation große Analogien. Bei der Maus wird der MHC als H-2 Komplex (*histocompatibility-2*) bezeichnet und liegt auf Chromosom 17 (Klein, 1975). Mittlerweile ist der MHC des Menschen vollständig sequenziert. Er wird als HLA Komplex (*human leucocyte antigen*) bezeichnet und liegt auf Chromosom 6 (Strominger, 1985). Seine Grösse umfasst circa 4×10^6 Basenpaare und mehr als 200 Gene, wobei ausserhalb des MHC liegende Gene nicht miteingerechnet sind. Die entsprechende, als RT1 Komplex (*rat locus 1*) bezeichnete Genregion der Ratte, konnte auf Chromosom 20 identifiziert werden (Locker et al., 1990).

1.2.1. Die Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes

Der MHC kodiert für verschiedene Klassen von Proteinen.

MHC Klasse I Moleküle stellen die klassischen Transplantationsantigene dar. Sie werden als integrale, polymorphe Membranproteine auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert. Die physiologische Funktion der MHC Klasse I Moleküle besteht in der Präsentation von endogenen Peptiden Virus befallener oder neoplastisch entarteter Zellen gegen zytotoxische T-Zellen. Dies führt in der Regel zur Zellyse durch die zytotoxische T-Zelle (Zinkernagel und Doherty, 1979). MHC Klasse I Moleküle bestehen aus hochpolymorphen Glycoproteinen. Bei der hochpolymorphen α -Kette handelt es sich um ein Transmembranprotein von etwa 44-47 kD, dessen extrazytoplasmatischer Teil in drei globuläre Domänen (α_1 , α_2 , α_3) gegliedert ist. Die nichtpolymorphe leichte Kette mit dem Namen β_2 Mikroglobulin ist kein Transmembranmolekül. Sie besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 12 kD. Sie ist an der α_3 Domäne nicht kovalent assoziiert und wird außerhalb des MHC kodiert (Robinson et al., 1981). Beide Ketten assoziieren im ER zu einer globulären Struktur, deren korrekte Faltung und Stabilisierung die Anlagerung eines Peptids erfordert (Bjorkman et al., 1987). Hat sich ein stabiler Peptid-MHC Klasse I Komplex im ER ausgebildet, so wird dieser zur Zelloberfläche transportiert und steht dann für die T-Zell Erkennung bereit. Dieser Prozess wird auch als endogenen Weg der Antigenpräsentation bezeichnet. 1987 konnte erstmals durch Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale Struktur eines HLA-A2 Moleküls aufgeklärt werden (Bjorkman et al., 1987). Die Bindungsgrube wird von der α_1 und α_2 Domäne gleichermaßen gebildet. Die Seiten der Bindungsgrube werden von einer α -Helix, der Boden von β -Faltblättern gebildet. Die Enden der Bindungsgrube sind durch Wechselwirkung der α -Helices und β -Faltblätter geschlossen, so dass in der Regel nur Peptide mit einer Länge von ungefähr 9-11 Aminosäuren binden können.

Andere MHC-Klasse I homologe Gene liegen außerhalb der MHC Region, wie z.B. die CD1 Familie. Diese Moleküle werden auf dendritischen Zellen, Monozyten und einigen Thymozyten exprimiert, ähneln MHC Klasse I Molekülen, unterscheiden sich jedoch in der molekularen Organisation von diesen und in der Präsentation ihrer Liganden voneinander. CD1 Moleküle binden und präsentieren Glykolipide, besonders mycobakterielle Membrankomponenten (Brossay und Kronenberg 1999).

MHC Klasse II Moleküle werden im Gegensatz zu MHC Klasse I Molekülen auf bestimmten Zellpopulationen exprimiert. Eine konstitutive Expression erfolgt nur in B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Langerhans Zellen der Haut.

Fakultativ kann die Expression auf Makrophagen, Astrocyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Keratinozyten sowie in Mensch und Ratte auch auf T-Lymphozyten in Gegenwart von Cytokinen induziert werden. Das MHC Klasse II Molekül wird auf der Zelloberfläche als ein glykosyliertes Transmembranmolekül, bestehend aus polymorphen, über Disulfidbrücken kovalent gebundenen α - und β -Ketten, exprimiert. Es besitzt ebenfalls eine Peptidbindungsgrube, die aber anders als bei Klasse I Molekülen erst in endolysosomalen Kompartimenten mit Peptid beladen wird. Die Peptide stammen z.T. aus dem enzymatischen Abbau zelleigener Proteine, aber auch aus dem Abbau antigener Proteine, wie z.B. von phagozytierten Bakterien. Die physiologische Aufgabe besteht in der Präsentation der endolysosomalen Peptide an Klasse II restringierte T-Helfer Lymphozyten. Dieser Weg der Antigenpräsentation wird daher auch als „exogener Weg“ bezeichnet. Klasse II exprimierende Zellen werden auch als Antigen-Präsentationszellen bezeichnet. Durch Reporter-Gen-Assays wurden zunehmend Befunde gewonnen, die einen Kreuzungspunkt des Klasse I vermittelten Antigen-Präsentationsweges mit dem Klasse II Präsentationsweg beschreiben (Shen et al., 1997). In diesem Zusammenhang wird berichtet, dass immortalisierte knochenmarksdendritische Zellen Fragmente aus exogen aufgenommenem Ovalbumin (Ova) sowohl im Verbund mit MHC Klasse II, als auch Klasse I Molekülen präsentieren (Rock und Goldberg, 1999). Die physiologische Bedeutung einer Kreuzung beider Präsentationswege bleibt allerdings umstritten. Die dreidimensionale Struktur konnte 1993 am Beispiel des HLA-DR1 Moleküls aufgeklärt werden (Brown et al., 1993). Beide Ketten besitzen im extrazellulären Teil je zwei Domänen, von denen alle bis auf die $\alpha 1$ Domäne Disulfidbrücken ausbilden. Die Bindungsgrube, die an den Enden beidseitig geöffnet ist, wird von den $\alpha 1$ und $\beta 1$ Domänen gebildet.

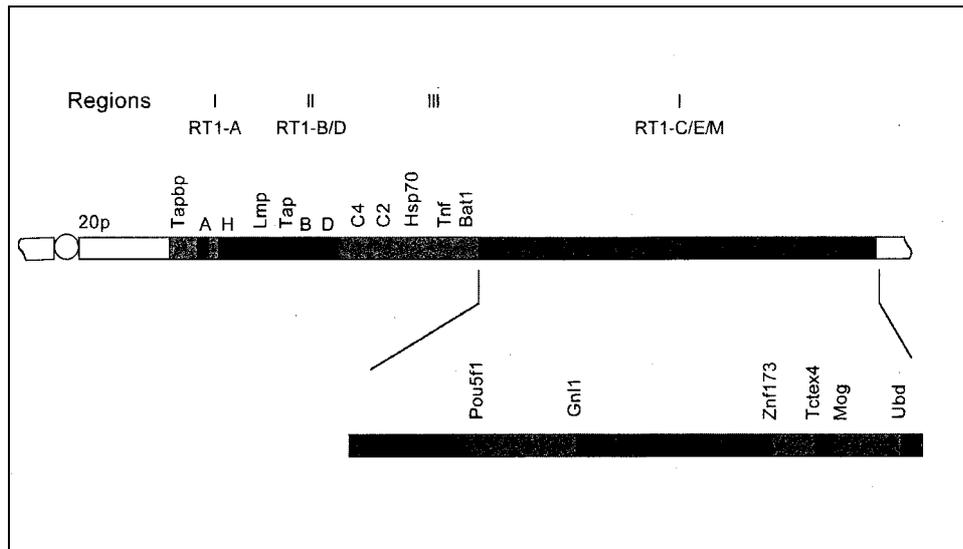
Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass Peptide mit einer Länge von 12-24 Aminosäuren binden können. Inzwischen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ganze Proteine in der Bindungsgrube binden können, so dass die Möglichkeit des Prozessierens eines Proteins gebunden am Klasse II Molekül berücksichtigt werden muß (Castellino et al., 1998).

Zu weiteren, in der Klasse II Region des MHC vorliegenden Proteinen gehört der TAP Transporter (*transporter in antigen processing*), welcher aus zwei Genen besteht, die strukturell eng mit den LMP-Genen verwandt sind. Diese kodieren für Komponenten des Proteasom. Der TAP-Transporter sitzt in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und ermöglicht den Transport von cytoplasmatischen Peptiden, wie z.B. viralen Peptiden, in das Lumen des ER (Owen und Pease, 1999).

Bestimmte MHC Klasse III Moleküle sind Bestandteile des Komplementsystems. Sie sind nicht polymorph und zeigen weder strukturelle noch funktionelle Homologie zu den MHC Klasse I oder II Molekülen (Sackstein und Colten, 1984). Ihre Gene liegen im MHC zwischen denen der Klasse II und Klasse I Gene. Eine Vielzahl von Genen, welche ebenfalls im MHC kodiert sind, übernehmen weitere, spezialisierte Funktionen in der Immunität. Z.B. übernimmt die MHC Klasse Ib, dies sind Gene mit geringem Polymorphismus, welche sich in der Klasse I Region des MHC befinden, wichtige Funktionen in der angeborenen Immunität.

1.2.2. Der RT1B-Komplex

Der MHC der Ratte wurde erstmals von Bodgen und Apetkman et al. 1960 beschrieben. Serologische Untersuchungen führten zu der Entdeckung eines MHC Klasse I Transplantationsantigens, das als R-1 Faktor bezeichnet wurde. Aufgrund gemischter Lymphozyten Reaktion (*mixed lymphocyte reactions*, MLR), konnte die Existenz von Klasse II Molekülen nachgewiesen werden (Silvers et al., 1967). Rekombinationsanalysen an verschiedenen Ratteninzuchtstämmen lieferten weitere Erkenntnisse über den zunächst als H-1 und heute als RT1 bezeichneten Haplotyp der Ratte (3,5-4MB). Mittlerweile ist eine Untergliederung in eine RT1.A-, RT1.B/D- und RT1.C/E/M-Region möglich geworden. Der MHC der Ratte enthält zwei Klasse I Regionen (A, C/E/M) (Dressel et al., 2001, Abbildung). Die Loci RT1.A und E sind homolog zu den Loci H-2K und H-2D der Maus.



Die Klasse II Region konnte unter Verwendung von kreuzreagierenden, subregion-spezifischen anti-Maus-Klasse II-Antisera in die Subregionen B und D unterteilt werden (Lobel und Cramer, 1981 und Dressel et al., 2001). Biochemische Untersuchungen ergaben Homologien zu den murinen Klasse II Loci H2-A und H2-E (Shinohara et al., 1981).

1990 konnte im Bereich der RT1.B Region eine weitere Gruppe von polymorphen Genen identifiziert werden, die ursprünglich als „mtp1“ und „mtp2“ (MHC linked transporter proteins) bezeichnet wurden (Deverson et al., 1990). Nach einer einheitlichen Nomenklatur nennt man diese Genloci heute „Tap-1“ und „Tap-2“ (*transporters associated with antigen processing*). Die Genprodukte bilden ein in der Membran verankertes Heterodimer und transportieren in einem ATP-getriebenen Prozess zytosolische Peptide in das Lumen des ER, in dem Klasse I Moleküle für eine Beladung bereitstehen (Owen und Pease, 1990).

1991 wurden bei der Analyse einer Maus MHC Cosmid-Bank innerhalb der Klasse II Region drei neue Gene gefunden und als Ma, Mb1 und Mb2 bezeichnet (Cho et al., 1991). Aufgrund der Sequenzhomologien wurden sie als Klasse II ähnlich klassifiziert. Im Humansystem finden sich die homologen Gene HLA-DM α und HLA-DM β (Kelly et al., 1991). Die zur Ratte homologen Gene wurden in Analogie zum Humansystem als RT1.DMa und RT1.DMb bezeichnet (Kurth et al., 1997). In unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert liegen die Hsp-70 Gene (Steinmetz et al., 1982). Sie kodieren für eine phylogenetisch alte, hoch konservierte Familie von Stress-Proteinen, deren immunologische Relevanz diskutiert wird.

1.2.3. HLA-DM und die invariante Kette

1978 entdeckte P. Jones bei der Maus ein basisches Protein mit einem Molekulargewicht von 31kD, das nicht kovalent am Klasse II Molekül assoziiert war. Das Protein zeigte bei allen untersuchten Haplotypen einer Spezies das gleiche Wanderungsverhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese, ganz im Gegensatz zu den polymorphen Klasse II Molekülen. Daher wurde es als invariante Kette (Ii) bezeichnet. Der Genlocus liegt bei der Maus auf Chromosom 18 (Yamamoto et al., 1985), beim Menschen auf Chromosom 5 (Claesson et al., 1984). Die invariante Kette besitzt eine umgekehrte Membranorientierung, bei der das carboxyterminale Ende extrazytoplasmatisch ausgerichtet ist.

Die invariante Kette assoziiert nach der Synthese am endoplasmatischen Retikulum aufgrund eines Trimerisierungssignals im carboxyterminalen Bereich zu Homotrimeren (Cresswell, 1996). An diese lagern sich sukzessive drei Klasse II Moleküle im Bereich von Aminosäure 83-107 an. Dieser als CLIP (*class II invariant chain peptide*) bezeichnete Bereich blockiert im ER die Bindungsgrube des Klasse II Moleküls und verhindert so die Beladung mit endogenem Peptid. Dieser Nonamer-Komplex gelangt aufgrund von mindestens zwei Transportsignalen durch den Golgi-Apparat hin zu endosomalen/lysosomalen Kompartimenten, in denen die invariante Kette sequenziell proteolytisch gespalten wird. Diese Spaltung wird durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Zytokine beeinflusst (Lennon-Dumenil et al., 2002). Nach dieser Spaltung wird die Bindungsgrube mit exogenem Peptid beladen und das Klasse II Molekül an die Zelloberfläche transportiert.

Die physiologische Aufgabe der invarianten Kette besteht nach bisherigen Analysen im Schutz der Klasse II Bindungsgrube im ER vor der Beladung mit endogenen Peptiden.

Darüber hinaus ermöglicht sie den Transport des Nonamer-Komplexes aus dem ER zu den endosomalen Kompartimenten, in denen der Peptidaustausch stattfindet.

Über welchen Mechanismus der Peptidaustausch erfolgt ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnte mit der Entdeckung von HLA-DM ein weiteres Molekül des Antigenprozessierungs- und Beladungs-Apparates identifiziert werden, dem eine wichtige Funktion bei der Peptid-Beladung von Klasse II Molekülen zukommt.

HLA-DM wird in allen MHC Klasse II exprimierenden Zellen gefunden (Busch und Mellins, 1996) und seine Expression ist mit der von Klasse II Molekülen koreguliert. Die HLA-DM Gene liegen in der Nähe TAP und LMP-Gene und sie werden nicht auf der Zelloberfläche

exprimiert. HLA-DM erleichtert die Peptidbeladung der MHC Klasse II Moleküle, stabilisiert „leere“ MHC Klasse II Moleküle und selektiert optimal bindende Peptide. So wirkt HLA-DM als Katalysator, Chaperon und Peptideditor zugleich. Die α -Kette ist ein nicht polymorphes Transmembranprotein und besitzt bei Mensch, Ratte und Maus ein Molekulargewicht von ca. 26 kD. Die β -Kette ist ebenfalls ein nichtpolymorphes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kD. Die Ketten werden am ER synthetisiert und lagern sich im Lumen des ER zu einem Heterodimer zusammen (Copier et al., 1996). Die dreidimensionale Struktur von DM konnte vor wenigen Jahren von Mosyak et al., 1998 aufgeklärt werden. Die Struktur ist ähnlich der von Klasse II Molekülen. Im Vergleich finden sich zwei weitere Disulfidbrücken. Aufgrund dieser Disulfidbrücken ist DM nicht in der Lage eine Antigenbindungsgrube auszubilden. Die Aktivität von HLA-DM ist über ein weiteres Molekül, DO reguliert, dessen Gene DN α und DO β zu den Klasse II-Genen gehören.

All diese MHC Klasse II-Moleküle sind besonders durch IFN- γ , welches von aktivierten T-Zellen, sowie NK-Zellen produziert wird, über einen transkriptionellen Aktivator namens MHC Klasse II Transaktivator (CIITA), reguliert. Die Abwesenheit von CIITA führt durch das Fehlen von MHC Klasse II-Molekülen zu schweren Immundefizienzen (Herberg et al., 1998).

1.2.4. Die Reifung von MHC Klasse II Molekülen

Die Zusammenlagerung der α - und β -Ketten erfolgt kurz nach deren Synthese im endoplasmatischen Retikulum unter Beteiligung des heavy chain binding proteins (BiP). Unter Abspaltung von BiP und Calnexin kommt es zu einer Umlagerung dieses transienten, hochmolekularen Komplexes, wobei Nonamerkomplexe bestehend aus drei $\alpha\beta$ -Ketten und drei Invariantenkette gebildet werden. Diese sind nicht zur Peptidbindung befähigt, da die Aminosäurereste 81 – 104 der invarianten Kette die Bindungsgrube blockieren (Cresswell, 1994). Anschließend erfolgt der Transport des Nonamerkomplexes, aufgrund von mindestens zwei Transportmotiven in zytosolischen Anteil der invarianten Kette, von ER durch den trans-Golgi Apparat hin zu endosomalen, lysosomalen Zellkompartimenten. Der Transport kann entweder direkt, oder indirekt über die Zytoplasmamembran erfolgen (Roche et al., 1994). Der Transport von DM aus dem Golgi-Apparat, hin zu endosomalen Kompartimenten ist abhängig von mindestens zwei Transportsignalen im zytoplasmatischen Anteil der β -Kette.

In den endo-/lysosomalen Kompartimenten erfolgt eine sequentielle Proteolyse der invarianten Kette, ausgehend vom luminalen, carboxyterminalen Ende, resultierend in CLIP (*class II associated invariant chain peptid*, Aminosäurereste 81 – 104) (Riese et al., 1996). DM katalysiert anschließend den Austausch von CLIP und Antigen in der Bindungsgrube und es folgt der Transport des reifen Klasse II Molekül auf die Zelloberfläche. Der DM katalysierte Peptidbeladungsmechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Für den Abbau der invarianten Kette zu CLIP ist die Cysteinprotease Kathepsin S essentiell (Riese et al., 1996).

1.3. Autoimmunität und die Rolle des MHC

Autoimmunität als immunologische Dysfunktion gewinnt in der modernen Forschung immer mehr an Bedeutung. Ein tieferes Verständnis einer im Tiermodell induzierten Autoimmunerkrankung führt dabei nicht nur zu wirkungsvolleren therapeutischen Ansätzen, sondern auch zu einer besseren Kenntnis immunologischer Vorgänge im Allgemeinen.

Im Tiermodell lassen sich genetische, umweltbedingte und pathogene Aspekte von Autoimmunerkrankungen analysieren. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Autoimmunität ein komplexes Zusammenspiel aus vielen Komponenten ist. So hat sowohl die Immunregulation mit Zytokinen, B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen eine wichtige Funktion, als auch die Umweltpathogene. Eine wesentliche Rolle jedoch kommt der genetischen Disposition zu (Ehrmann und Fathman, 2002). Eine gemeinsame Eigenschaft autoimmuner Erkrankungen ist ihr Auftreten in Familien, was auf eine genetische Komponente hindeutet. Die Genetik autoimmuner Fehlfunktionen in humanen und Tiermodellen ist komplex und umfasst eine grosse Zahl von Genen (Wandstrat und Wakeland, 2002). Zum Beispiel sind allelische Varianten auf Chromosomen direkt an einem erhöhten Krankheitsrisiko beteiligt. Viele dieser „susceptibility regions“ sind beim Menschen und bei Nagetieren ähnlich.

Ein Genbereich jedoch zeigt eine besonders starke Verbindung mit Autoimmunität: der MHC. Die Assoziation zwischen MHC Produkten und autoimmunen Dysfunktionen ist seit mehr als 20 Jahren bekannt und ist eines der Hauptargumente für eine Beteiligung der Antigenpräsentationsereignisse und der T-Zellen in der Pathogenese bei Autoimmunerkrankungen.

Viele dieser Erkenntnisse wurden über Jahre im Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS) gewonnen. Die aussergewöhnliche Empfänglichkeit der Lewis-Ratte (LEW) für eine Vielzahl induzierbarer gewebespezifischer Autoimmunerkrankungen (z.B. Neuritis, Uveitis und Arthritis) hat sie zu einem der meiststudierten Modellsysteme im Bereich Autoimmunforschung gemacht. Das am besten charakterisierte Krankheitsmodell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine hauptsächlich CD4⁺ T-Zell vermittelte inflammatorische paralytische Erkrankung des ZNS, die als Modell der humanen, demyelinierenden Erkrankungen des ZNS, wie z.B. der MS, steht (Swanborg, 1995). Das initierende Ereignis der MS ist immer noch unbekannt, könnte aber mit einer Infektion genetisch empfänglicher Individuen mit viralen oder bakteriellen Pathogenen zusammen hängen, welche zu einer T-Zellaktivierung und Antikörperproduktion führt, die wiederum kreuzreagieren mit Mimikry Motiven der Myelin Antigene. In MS involvierte Autoantigene sind besonders Myelin basisches Protein (MBP), proteolipid Protein (PLP) und Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG), welche im weissen Bereich des ZNS exprimiert werden. EAE kann bei der Lewisratte aktiv durch subkutane Injektion von Myelin basischem Protein (MBP) in CFA, oder passiv durch adoptiven Transfer von *in vitro* MBP-restimulierten autoreaktiven T-Zellen von MBP-sensitivierten syngenem Spenderratten induziert werden (Swanborg, 1988). Der klinische Verlauf einer MBP induzierten EAE zeigt sich in der Lewisratte als zunehmende Paralyse, welche akut, monophasisch und selbstlimitierend ist. Diese Charakteristika machen die EAE zu einem idealen Modell für regulatorische Ereignisse, die zur Entstehung der Erkrankung und zur Genesung führen (Swanborg, 1995). Die Suszeptibilität für die Entstehung der EAE hängt wie bereits erwähnt vom MHC Haplotyp und vom genetischen Hintergrund ab (nicht MHC Gene) (Williams und Moore, 1973). Hierbei gibt es eine Präferenz des BV8S2 (Vβ8.2) Gens im exprimierten T-Zellrezeptor in der RT1B^l restringierten Immunantwort der Lewisratte auf MBP. Im Fall der EAE der Lewisratte ist der RT1B^l-Haplotyp das Restriktionselement für autoreaktive MBP spezifische CD4 T-Zellen. Dadurch wurde RT1B^l zum Gegenstand zahlreicher Untersuchungen zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze. Die Peptidbindungseigenschaften von RT1B^l sind gut charakterisiert (Wauben et al., 1997 und Reizis et al., 1996) und es weist eine hohe Sequenzhomologie zu IA^d, einem anderen gut charakterisierten MHC Klasse II Molekül der Maus, das oft rekombinant exprimiert, in Studien benutzt wird, auf.

1.4. Die Interaktion von TCR, MHC und Peptid

Die Interaktion von TCR mit Peptid-MHC ist in Bezug auf die Erkennung des Peptids bis heute relativ gut charakterisiert.

Die ersten murinen und humanen TCR/Peptid-MHC Interaktionen wurden 1996 strukturell bestimmt (Garcia et al., 1996 und Garboczi et al., 1996). Mitterweile sind 11 Kristallstrukturen von TCR Peptid-MHC Komplexen bekannt, welche wichtige Erkenntnisse über die Interaktion von TCR mit Peptid-MHC lieferten (Rudolph und Wilson 2002).

Der TCR nimmt dabei eine fast diagonale Position zum Peptid-MHC ein (Garcia et al., 1996). Reinherz et al. konnte 1999 bei einem MHC Klasse II Molekül auch eine orthogonale Orientierung nachweisen, wobei konservierte Interaktionen, die diese Orientierung vorgeben noch nicht bestimmt wurden. Weiterhin ist die spezifische Interaktion eines TCR mit seinem kognaten Peptid-MHC relativ variabel und ist durch gebundene Wassermoleküle am TCR/Peptid-MHC Übergang gekennzeichnet (Reiser et al., 2000). Wasser erhöht nochmals die Komplementarität und Spezifität durch das Einlagern in kleine Hohlräume innerhalb des TCR/Peptid-MHC Übergangs. Dies wurde bereits bei Antikörpern durch Bhat et al. 1994 gezeigt. Über die Bindung von sogenannten „altered peptid ligands“ konnte in zwei Systemen der Einfluss von kleinsten Konformationsänderungen am TCR-Peptid-MHC Übergang auf die Signalstärke in der T-Zelle gezeigt werden.

Außerdem können elektrostatische Interaktionen über Salzbrücken und Wasserstoffbindungen bei der Präorientierung des TCR und des Peptid-MHC eine Rolle spielen (Wilson, 1999). 2001 wurde die erste Kristallstruktur eines humanen γ/δ T-Zell-rezeptors von Allison et al. gezeigt (Allison et al., 2001). Diese Struktur bestätigte die Voraussage, dass die drei Hauptrezeptoren der Antigenerkennung (Immunglobuline, α/β T-Zellrezeptoren und γ/δ T-Zellrezeptoren) eine ähnliche Gesamtanatomie haben. Weiterhin wurde die antikörperähnliche Struktur des γ/δ T-Zellrezeptors durch die CDR3 Schleifen Länge bestätigt. Die Studie zeigte auch mögliche Bindungsstellen für Phospholipanden auf, eine auf die γ/δ T-Zellen beschränkte erkannte Antigengruppe auf. Für den T-Zellrezeptor und hier besonders in Bezug auf die Bindung von Superantigenen, konnte bisher lediglich die SAg und TCR β -Kette Interaktion des V β 8.2 Moleküls komplexiert mit zwei unterschiedlichen SAg, SEC3 oder SEB, gezeigt werden. Diese Studien konnten belegen, dass ein Bindungsmotif für die SAg/TCR Interaktion

existiert. Dabei bindet das SAg hauptsächlich über Kontakte von Resten der CDR2 Region und zu einem geringen Anteil der hypervariablen Region 4 (HV4) an den TCR. Weiterhin werden alle Wasserstoffbrücken über Hauptatome des V β 8.2 Moleküls gebildet und dies in konformationsabhängiger Weise. Per definitionem sind dies Interaktionen zwischen Molekülen, welche hauptsächlich auf der atomaren Struktur des Proteinerückgrates der V β Domäne beruhen. Sie sind relativ unabhängig von der Aminosäurestruktur und, als Konsequenz, auch unabhängig von der Seitenkettenstruktur (Sundberg et al., 2002). Strukturelle Variationen sind im Bereich der V β Domänen hauptsächlich auf die drei CDR Schleifen beschränkt. Neuerdings wurden auch die Strukturen von zwei weiteren SAg/TCR β -Ketten Komplexen aufgeklärt (SpeA gebunden an V β 8.2 und SpeC gebunden an V β 2.1, Sundberg und Mariuzza, unpublizierte Daten in Sundberg et al., 2002), was zu einer detaillierteren Analyse der SAg/TCR Interaktion und deren Bindungsanforderungen beitragen wird.

Um die Immunantwort gegen Pathogene oder Tumore weiter zu charakterisieren, werden seit einigen Jahren Methoden zur direkten Erkennung von spezifischen Lymphozyten eingesetzt. Momentan werden mehrere neue Methoden angewandt, um Anzahl und Funktion von spezifischen T-Zellen zu messen. Eine der wichtigsten davon stellt die Tetramer-Technologie von MHC Molekülen dar. Hierbei werden rekombinant produzierte, gereinigte und mit einer Biotinylierungssequenz versehene MHC Moleküle (extrazelluläre Bereiche), mit Antigen beladen und über ein fluoreszenz-markiertes Streptavidinmolekül multimerisiert und dadurch die Avidität der Bindung an den TCR stark erhöht. Dies ermöglichte erstmals einen direkten Nachweis von spezifischen T-Zellen. Als Modelle wurden z.B. als Mausmodelle bisher das LMCV (Lymphozyten Choriomeningitis Virus), das Influenzavirus oder VSV (Vesicular Stomatitis Virus) und als Humanmodelle HIV, EBV (Epstein-Barr Virus) oder Hepatitis B/C Virus eingesetzt (Klenerman et al., 2002).

HLA Klasse I Tetramere lieferten z.B. wichtige Erkenntnisse über das Proliferationsverhalten von CD8⁺ T-Zellen nach einer akuten Infektion, z.B. in LMCV Mäusen (McMichael et al., 1999).

Die Vorteile der Tetramermethode liegt in ihrer Spezifität und Sensitivität, welche eine Oberflächen- und intrazelluläre Phänotypisierung erlaubt. Außerdem kann sie leicht mit funktionellen Tests kombiniert werden. Nachteilig ist die Tatsache, dass nur Einzel-spezifitäten analysiert werden können, was z.B. im Falle einer HIV oder Epstein-Barr-Virus Infektion mit mehreren relevanten Epitopen, ein Problem darstellt.

Weiterhin stellen MHC Klasse II Tetramere aufgrund ihrer molekularen Struktur (besonders bei der Renaturierung) und dem Aktivierungszustand der entsprechenden T-Zellen immer noch technisch eine besondere Herausforderung dar und erst allmählich können in Maus- (mit LCMV-Peptiden) und Humanmodellen (mit Influenza- und HSV-Peptiden) erste Erkenntnisse über die Expansion von CD4⁺ T-Zellen gewonnen werden (Klenerman et al., 2002). Es bleibt abzuwarten, wie sich die Tetramermethode und allgemein Methoden der direkten Erkennung von T-Zellen, auch im Hinblick auf den Einsatz nichtklassischer T-Zellliganden, entwickeln wird.

1.5. Autoantigen- und Superantigenbindung an MHC Klasse II

Das RT1B^l-Molekül und seine charakteristischen Bindungseigenschaften in Bezug auf agonistische und antagonistische Peptide lieferte hierbei auch ohne Kristallstruktur auch wichtige Erkenntnisse.

Ein wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der Bindungsspezifität von RT1B^l konnte durch Reizis et al. 1996 geleistet werden. Diese Gruppe konnte als erste zeigen, dass das RT1B^l Bindungsmotif aus einer Nonamersequenz mit vier Hauptankerpositionen besteht. Dabei sind besonders die Positionen P4 und P9 für die Bindung von Bedeutung, mehr noch, als P1. Negativ geladene Reste werden an P9 bevorzugt, was in Übereinstimmung mit dem vorhandenen Serin an Position 57 der RT1B^l β -Kette ist. Position 4 bindet hauptsächlich große, polare und positiv geladene Seitenketten des Peptids. Ebenfalls die konservierte Position 3, welche mit mittelgroßen Resten, wie Val, Ser und Thr assoziiert ist. Eine generelle Präferenz für große polare Reste wurde ebenfalls an Position 7 gefunden. Bei manchen getesteten Peptiden war die Position 1 nicht relevant. Dies ist auch unter dem Gesichtspunkt interessant, dass alle HLA-DR und I-E Peptidmotive, die bisher beschrieben wurden, einen

hydrophoben Rest an dieser Position binden. Trotzdem liegt an dieser Position bei RT1B¹ eine Präferenz für polare, aliphatische Reste vor (Reizis et al., 1996).

Dieses Motif war jedoch qualitativ unvollständig, da es nicht alle Peptidreste an allen Positionen charakterisierte. So konnte über weiterführende Bindungstests, ebenfalls 1996, ein erweitertes Peptid-Bindungsmotif für RT1B¹ mit MBP₇₂₋₈₅ erstellt werden. Dieses Bindungsmotif umfasst zwei Cluster von Resten, welche für die MHC-Bindung wichtig sind.

Die Nonamersequenz konnte bestätigt werden, wobei Position 9 die wichtigste Ankerposition ist (negative Ladung). Sie liegt C-terminal, ebenso wie die Positionen 7 und 8. N-terminal liegen die Positionen 1 und 3, welche ebenfalls in die RT1B¹ Bindung involviert sind. Bei den anderen Positionen spielt die Ladung und die Hydrophilität der Aminosäure eine entscheidende Rolle (Wauben et al., 1997). Schmelz et al. konnte darüber hinaus zeigen, dass Aspartat an Position 82 des Myelin basischen Proteins (MBP) obligatorisch für die Aktivierung spezifischer V β 8.2⁺ T-Zellen und die daraus resultierende Enzephalogenität in der Lewisratte ist.

Die Aminosäureseitenketten der Reste 4 und 6 von MBP₇₂₋₈₅ sind dahingehend von Bedeutung, da diese in tiefen Taschen des MHC Klasse II Moleküls gebunden werden. An Position 4 kann eine geladene hydrophile Substitution die Bindungsaffinität stark erhöhen. Jedoch sind diese Reste „Hilfspositionen“, sie können also umgangen werden, ohne dass es zu einem Verlust der Peptidbindung führt. Die Bindungstaschen von MHC Klasse II Molekülen sind generell permissiver in der Akkomodation unterschiedlicher Aminosäureseitenketten, als die der MHC Klasse I Moleküle. Aufgrund dieser Tatsache fällt es schwerer Ankerreste von bindenden Peptiden zu definieren. Die meisten RT1B¹ bindenden Peptide besitzen jedoch nicht alle Ankerreste. Der Aufbau und die sterischen Verhältnisse der Taschen bei MHC Klasse II Molekülen variiert leicht für die unterschiedlichen MHC Moleküle. Die P1-Tasche, die größte und höchst hydrophobe, scheint die Hauptdeterminante für HLA-DR1 Bindung zu sein (Stern et al., 1994). Darüber hinaus bestätigte sich in allen gut definierten Klasse II Liganden Motiven eine Präferenz für einen hydrophoben Ankerrest an Position 1. Jedoch scheint bei RT1B¹ die Position 1 kleiner und auch hydrophil zu sein im Vergleich zu anderen bekannten MHC Klasse II Sequenzen (z.B. I-E).

Superantigene (SA) sind eine Familie immunstimulatorischer und krankheitsauslösender Proteine, die von bakteriellen oder endogenen retroviralen Genen abstammen und fähig sind große Fraktionen von T-Zell Populationen (5-20%) zu aktivieren. Es scheint, als ob diese Aktivierung eine Brückeninteraktion zwischen der V β Domäne des TCR und des MHC Klasse II Moleküls benötigt. Über Kristallstrukturen konnten die detaillierten Interaktionen zwischen *Staphylococcus aureus* Toxin B (SEB), einem repräsentativen Superantigen mit der V β 8.2 T-Zellkette und die Interaktion zwischen SEB und HLA-DR1 bestimmt werden. Hierbei interagiert SEB direkt mit der MHC α 1 Domäne. Dies steht im Gegensatz zu der HLA-DR1 Interaktion mit SEH, einer anderen genetischen Subfamilie von *Staphylococcus aureus* Toxin, bei der die carboxyterminale Domäne von SEH mit der α -Helix der β 1-Domäne interagiert (Sundberg et al., 2002). Teilweise wird dies von Zink-Ionen vermittelt. Jedoch wurden bis jetzt noch keine trimolekularen TCR/SA/pMHC-Komplexe kristallin charakterisiert. Die Halbwertszeiten dieser Komplexe scheinen vergleichbar mit denen von TCR/pMHC zu sein. Mittlerweile werden eine Reihe weiterer Superantigene charakterisiert, wie *Mycoplasma arthritidis* Superantigen (MAS), *Yersinia pseudotuberculosis* Mitogen (YPM) oder Maus retrovirales MTV Superantigen. Diese sind strukturell jedoch unterschiedlich zu den vorher genannten Superantigenen (Sundberg et al., 2002).

1.6. $\gamma\delta$ -T-Zellen

1986 beschrieben Brenner und Mitarbeiter die Identifizierung einer zweiten Form des T-Zellrezeptors, den $\gamma\delta$ TZR (Brenner et al., 1986). Die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten machen etwa 0,5 % bis 10 % aller T-Zellen im peripheren menschlichen Blut aus (Poccia et al., 1997). In anderen Geweben wie der Haut oder Epithelien können bis zu 50 % aller CD3-positiven Zellen den $\gamma\delta$ TZR tragen (Boismenu und Havran, 1998). Die genetische Vielfalt der $\gamma\delta$ T-Zellen ist, verglichen mit den $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, begrenzt. Während zur Ausbildung eines $\alpha\beta$ TZR beim Menschen 50 Gensegmente für die V α -Kette und 46 Gensegmente für die V β -Kette existieren, benutzen $\gamma\delta$ T-Zellen weniger V Segmente, was jedoch auf die Rezeptorvielfalt kein Nachteil ist, da $\gamma\delta$ T-Zellen dies über die potentielle Vielfalt in der CDR3 kompensieren. Davon wird eine bestimmte Rezeptorkombination bevorzugt exprimiert; zwischen 50 % und 75 % aller $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im peripheren Blut des

erwachsenen Menschen tragen, besonders nach bakteriellen und parasitären Infektionen, einen V γ 9V δ 2 TCR (Morita et al., 1996).

Obwohl seit ihrer Entdeckung intensiv auf diesem Gebiet geforscht wurde, ist die Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen weiterhin unklar. Aufgrund ihres frühen Auftretens in der Ontogenese, ihrer limitierten Rezeptorvielfalt sowie des Vorkommens in Haut und Epithelien wurden die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten als „first line of defense“ bezeichnet (Janeway, 1988). Die Fragen nach der genauen Rolle der $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Immunantwort gegenüber Tumoren, Viren, Bakterien und Protozoen, ihren *in vivo* relevanten Antigenen, dem Mechanismus der Antigenerkennung sowie der Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems bleiben aber bis heute unbeantwortet.

Während die $\alpha\beta$ T-Zellen entweder der CD4- oder der CD8-Linie angehören, exprimieren die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen des peripheren Blutes und der lymphatischen Organe keinen der beiden Korezeptoren; sie werden daher auch als doppelt negative Zellen (DN, CD4⁻CD8⁻) bezeichnet.

Unter den epithelialen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten findet man dagegen einen großen Anteil an CD8-positiven Zellen (Haas et al., 1993). Anders als die $\alpha\beta$ T-Zellen, bei denen MHC II/CD4- bzw. MHC I/CD8-Interaktion zur positiven Selektion unbedingt erforderlich ist, entwickeln sich $\gamma\delta$ T-Zellen auch in Abwesenheit von klassischen HLA-Molekülen normal (Correa et al., 1992; Bigby et al., 1993).

Im Vergleich zum $\alpha\beta$ TCR oder auch zu Immunglobulinen ist die Anzahl der V-, D- und J-Segmente beim $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor relativ klein. Das Einfügen von N-Nukleotiden (*nontemplate-encoded*) an den Verknüpfungsstellen von Gensegmenten (z.B. V/D oder V/L) ermöglicht dennoch die Entstehung einer großen Variabilität. Diese N-Segmente erhöhen die Diversität in der sogenannten CDR3. (*complementary determining region*), die besonders bei Immunglobulinen und dem $\alpha\beta$ TCR eine wichtige Rolle bei der spezifischen Bindung von Liganden spielen (Kaufmann, 1996). Rock und Mitarbeiter untersuchten 1994 die Längenverteilung der CDR3-Region von Immunglobulinen, $\alpha\beta$ TCR und $\gamma\delta$ TCR sowohl in der Maus als auch beim Menschen (Rock et al., 1994). Es zeigte sich, daß die CDR3-Region des $\gamma\delta$ TCR eine viel größere Ähnlichkeit mit der CDR3-Region von Immunglobulin-

molekülen besitzt als mit der des $\alpha\beta$ TCR. Sowohl α - als auch β -Kette weisen relativ kurze CDR3-Regionen einheitlicher Länge auf, meist zwischen 8 und 11 Aminosäuren. Dies erscheint auch physiologisch „sinnvoll“, da beide Ketten sowohl mit dem MHC-Molekül als auch mit dem gebundenen Peptid interagieren müssen; eine längere Schlaufe könnte zu sterischer Hinderung führen. Dagegen unterscheiden sich γ - und δ -Kette des TCR deutlich: Während die γ -Kette sich durch einheitliche, sehr kurze CDR3-Regionen ähnlich der leichten Immunglobulinkette kennzeichnet, streut die Länge der CDR3-Segmente der δ -Kette über einen weiten Bereich (bis zu 21 Aminosäuren). Eine ähnliche Verteilung weist auch die schwere Kette des Immunglobulinmoleküls auf. Auch neue, mittels Kristallstrukturanalyse gewonnene Daten zeigen, daß die TCR- δ -Kette strukturell eher den Immunglobulinen als dem $\alpha\beta$ -TCR ähnelt (Li et al., 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Antigenerkennung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten anscheinend über andere Mechanismen verläuft als bei $\alpha\beta$ T-Zellen.

1.6.1. Antigene für $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen

Die Suche nach Antigenen für $\gamma\delta$ T-Lymphozyten lieferte - neben der MHC-unabhängigen Entwicklung, dem Fehlen von CD4- und CD8-Corezeptoren und der Variabilität der CDR3-Region - eine Vielzahl weiterer experimenteller Hinweise darauf, daß sich $\gamma\delta$ T-Zellen im Hinblick auf ihren Mechanismus der Antigenerkennung fundamental von $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheiden. Einige Arbeiten im Maus-Modell beschreiben Protein-Antigene für $\gamma\delta$ T-Zellen, die aber nicht den immunologischen Vorstellungen von Antigenprozessierung und MHC-Präsentation entsprachen. Auch für humane $\gamma\delta$ T-Lymphozyten sind Protein-Antigene beschrieben. Holoshitz und Mitarbeiter sowie Haregewoin und Mitarbeiter identifizierten 1989 ein mycobakterielles Hitzeschockprotein, HSP65, als Antigen für $\gamma\delta$ T-Zellen (Haregewoin et al., 1989; Holoshitz et al., 1989). Auch andere Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes* und *Borrelia burgdorferi* produzieren Peptide oder Lipoproteine, die von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten erkannt werden (Munk et al., 1996; Vincent et al., 1998). Anders als im murinen System, wo Hitzeschockproteine *in vivo* vermutlich eine wichtige Rolle spielen (Kaufmann, 1996), ist die Bedeutung der HSP oder anderen Protein-Antigenen als natürliche

Liganden für humane V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten wohl eher gering (Kabelitz et al., 1990; de Libero, 1997).

1990 beschrieben Pfeffer und Mitarbeiter die Stimulation von humanen $\gamma\delta$ T-Zellen durch protease-resistente Liganden; eine niedermolekulare Fraktion (< 3 kDa) aus Lysaten von *Mycobacterium tuberculosis* induziert die selektive Expansion von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten weitaus effektiver als mycobakterielles HSP65. Weitere Charakteristika dieser Nicht-Peptidantigene sind hohe Hydrophilie, anionischer Charakter bei niedrigem pH, die Bindung an Lektine sowie ein für die biologische Aktivität essentieller terminaler Phosphatrest (Pfeffer et al., 1992; Schoel et al., 1994). Tanaka und Mitarbeiter isolierten und identifizierten 1994 Isopentenylpyrophosphat (IPP). Analoge synthetische Alkylphosphate wie Monoethylphosphat (MEP) zeigten ebenfalls stimulatorische Aktivität; durch Konjugation an Nukleotide wird die biologische Wirkung z. T. noch gesteigert. Diese Stimulation der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ist direkt T-Zellrezeptor-gekoppelt: Sie läßt sich durch TCR- δ -Antikörper blockieren. Durch Transfektion eines V γ 9V δ 2 TZR in eine ursprünglich TCR-negative T-Zelllinie kann in diesen Zellen eine Antwort sowohl gegenüber Daudi-Tumorzellen als auch gegen MEP oder mycobakterielle Lysate induziert werden (Tanaka et al., 1994; Tanaka et al., 1995, Bukowski et al., 1995).

Die Gruppe von Constant beschreibt seit 1994 in mehreren Veröffentlichungen die Isolierung und Charakterisierung einer weiteren Klasse von phosphorylierten Liganden für V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten aus *Mycobacterium tuberculosis*, die nach ihrer Elutionsreihenfolge bei RP18-Ionenpaarchromatographie als TUBAg1 bis TUBAg4 bezeichnet werden. Die Hauptverbindung in *M. tuberculosis*, TUBAg4, stellt ein substituiertes Thymidintriphosphat-Konjugat der allgemeinen Struktur T-PPP-X dar, das im Konzentrationsbereich von 2 nM bis 5 nM aktiv ist. Die enzymatische Spaltung mit Nukleotidpyrophosphatase führt zu dem biologisch inaktiven Thymidinmonophosphat (TMP) sowie einem aktiven Fragment X-P oder X-PP, das wie auch die Verbindungen TUBAg1 und TUBAg2 sensitiv gegenüber der Behandlung mit alkalischer Phosphatase ist (Constant et al., 1994).

Die Frage nach der Funktion und Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ist eng mit der Identifizierung ihrer *in vivo* relevanten Antigene verknüpft. Alle bislang beschriebenen sog. „Phospholiganden“ sind entweder nur partiell charakterisiert (wie z. B. TUBAg4) oder sind, wie im Fall von IPP oder Ribose-1-Phosphat, ubiquitäre Metabolite, die daher als Autoantigen wirken müssten. Zudem liegen bei diesen Verbindungen die zum Auslösen einer $\gamma\delta$ T-Zellantwort benötigten Konzentrationen bei 1 μ M bis 5 μ M (IPP) und 4 mM (Ribose-1-Phosphat). Es scheint, daß *in vivo* andere, potentere „Phospholiganden“ für die Stimulation von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten verantwortlich sind. Jooma et al. veröffentlichten kürzlich Daten, die belegen, dass ein alternativer Syntheseweg der Isoprenoidbiosynthese und dessen Intermediate, eine essentielle Rolle in der Aktivierung von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten spielt.

Der sogenannte MEP-Syntheseweg (2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphatweg) und hier besonders das Intermediat HMB-PP konnten als der stärkste bekannte Aktivator von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten identifiziert und charakterisiert werden. Im Vergleich zu anderen Aktivatoren genügen bereits Konzentrationen von 0,1 nM, um eine spezifische Reaktion hervorzurufen.

Bisphosphonate (BP) sind eine Klasse von Medikamenten, die seit über 20 Jahren häufig zur Behandlung von Osteoporose oder tumorassoziierter Osteolyse eingesetzt werden. Alle BP weisen als gemeinsames Merkmal eine P-C-P-Gruppierung auf; sie stellen damit Phosphatase-resistente Pyrophosphat-Analoga dar und besitzen eine sehr hohe Affinität zu Knochengewebe. Die stickstoffhaltigen Vertreter unter den BP werden Aminobisphosphonate genannt.

Die meisten Vertreter der Bisphosphonate scheinen auf die eine oder andere Weise in den Isoprenoidstoffwechsel der Zielzellen einzugreifen. Aminobisphosphonate mit kurzkettigen aliphatischen Resten wie Pamidronat oder Alendronat haben zwar keinen Einfluß auf die Aktivität der Squalensynthase, blockieren aber trotzdem die Steroidbiosynthese.

Ein bislang wenig beachtetes Merkmal der Aminobisphosphonate ist die Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen. Im Gegensatz zu den nicht-stickstoffhaltigen Verbindungen Etidronat und Clodronat induzieren Pamidronat und Alendronat *in vitro* eine selektive Aktivierung und das Auswachsen von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten aus einer gemischten PBL-Population.

De Libero et al. zeigten 2002, dass auch die Metaboliten des Mevalonat-Syntheseweges eine wichtige Rolle in der Aktivierung von V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten spielen. In Tumorzellen

verhindert die Blockade von HMGR (hydroxy-methylglutaryl-CoA Reduktase), dem limitierenden Enzym des Mevalonatweges die Akkumulation von Metaboliten und als Konsequenz, die Erkennung durch V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten. Eine Überexpression von HMGR führt jedoch zu einer starken Aktivierung. Besonders der Metabolit Farnesyl Pyrophosphat (FPP) und dessen Synthesenzym FPP-Synthase spielen eine zentrale Rolle in der Anreicherung von phosphorylierten Metaboliten durch HMGR in antigenpräsentierenden Zellen. Dies ist von besonderer Relevanz in bezug auf die Kontrolle von Zellen mit metabolischen Anormalitäten.

Vor kurzem wurde eine TCR-abhängige Stimulation von humanen V γ 9V δ 2 T Lymphozyten durch unterschiedliche Alkylamine beschrieben; diese Verbindungen werden in millimolaren Konzentrationen von verschiedenen Bakterien, u. a. von *Proteus morgani*, sezerniert und zeigen keine Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase (Bukowski et al., 1999). Die biologische Relevanz dieser Verbindungen, insbesondere im Hinblick auf die strukturellen Gemeinsamkeiten mit den Aminobisphosphonaten, ist aber noch unklar.

V γ 9V δ 2 T-Lymphozyten reagieren auf Stimulation durch synthetische „Phospholiganden“ oder mycobakterielle Extrakte mit der Expression charakteristischer Oberflächenmarker, mit Zytokinproduktion sowie mit bestimmten Effektormechanismen, z. B. der Lyse verschiedener Tumorzelllinien oder virusinfizierter Zellen. Die Stimulation durch „Phosphoantigene“ induziert die Expression der Aktivierungsmarker CD25 (IL-2R α) und CD69 (Wesch et al., 1997). Außerdem werden sowohl der Fas-Rezeptor CD95 als auch sein Ligand (FasL) auf der Zelloberfläche hochreguliert.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit Untersuchungen zum Mechanismus der Antigenerkennung von V γ 9V δ 2 T-Zellen, mit möglichen antigenpräsentierenden Zellen oder Oberflächenmolekülen sowie dem Einfluss löslicher Faktoren wie Zytokinen. Morita und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss der bis heute bekannten antigenpräsentierenden Moleküle auf die Stimulation von V γ 9V δ 2 T-Zellen (Morita et al., 1995). Die meisten der untersuchten Klone proliferieren nach Stimulation mit *M. tuberculosis*-Lysaten auch in Abwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen. Allerdings wird die Antwort durch Anwesenheit einer gemischten Population peripherer mononukleärer Lymphozyten (PMBC) oder in Gegenwart von exogenem IL-2 verstärkt. Auch das Fixieren der akzessorischen Zellen, wodurch deren Fähigkeit zur Antigenaufnahme und Prozessierung gestört ist, die aber noch kostimulatorische Signale vermitteln können, hat keinen Einfluss auf die Stimulation der

$\gamma\delta$ T-Zellen (Morita et al., 1995). Zudem setzen die Effektorfunktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen bereits wenige Minuten nach Kontakt mit dem Antigen ein (Fournié und Bonneville, 1996). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die klassischen Wege der Antigenprozessierung und -präsentation für die Antwort der $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten keine Rolle spielen. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass direkte Zell-Zell-Kontakte - zumindest der $\gamma\delta$ T-Zellen untereinander - eine notwendige Voraussetzung für eine Stimulation darstellen (Lang et al., 1995; Morita et al., 1995).

Im Gegensatz zu Morita und Mitarbeitern berichtet die Gruppe von Kabelitz, daß sowohl die Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen als auch von CD4-positiven T-Helferzellen für die Expansion von naiven $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten nach Stimulation mit mycobakteriellen Extrakten essentiell ist (Pechhold et al., 1994; Wesch et al., 1997). Auch hinsichtlich der Stimulation von $V\gamma9V\delta2$ T-Lymphozyten mit Daudi-Zellen ist der Einfluß von CD4-positiven „Bystander“ T-Zellen noch nicht geklärt. In Untersuchungen von Fayen und Tykocinski ist die Expansion von humanen $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit Daudi von der Anwesenheit von CD4-positiven T-Lymphozyten abhängig und läßt sich durch Antikörper gegen MHC II-Moleküle oder CD4 inhibieren; exogenes IL-2 kann die T-Helferzellen nicht ersetzen (Fayen und Tykocinski, 1999). Diese z. T. widersprüchlichen experimentellen Daten lassen bis heute noch kein klares Bild hinsichtlich der Antigenpräsentation bei $\gamma\delta$ T-Zellen zu. Auch ist die Art der untersuchten Zellpopulation, naive $\gamma\delta$ T-Lymphozyten oder $\gamma\delta$ T-Zellklone, von Bedeutung. Genauso wie bei $\alpha\beta$ T-Zellen sind auch bei naiven $\gamma\delta$ T-Lymphozyten zur Induktion von Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen zwei Signale notwendig: eine TCR-vermittelte Aktivierung sowie ein kostimulatorisches Signal. Das CD28/B7-System spielt auch hier eine wichtige Rolle, bei $\gamma\delta$ T-Zellen kann allerdings IL-2 dieses zweite Signal zumindest teilweise ersetzen (Hoft et al., 1998). Klone stellen dagegen eine bereits voraktivierte Population von Effektorzellen dar, die möglicherweise nicht mehr auf ein zweites Signal angewiesen ist.

Mehrere Veröffentlichungen betonen die polyklonale Expansion der $V\gamma9V\delta2$ T-Zellen nach Stimulation mit „Phosphoantigenen“. Die reaktive Population von $\gamma\delta$ T-Zellen weist also eine hohe Diversität ihrer V-J-D-Verknüpfungsregionen auf (Behr et al., 1996). Die Aktivierung scheint direkt durch den T-Zellrezeptor vermittelt zu sein. Die Stimulation durch IPP und andere synthetische Alkylphosphate sowie die Zytotoxizität gegenüber der Daudi-Zelllinie

wird durch Antikörper gegen den $\gamma\delta$ TZR blockiert, die Lyse der Erythroleukämie K562 dagegen nicht. Dies deutet darauf hin, daß bei der $\gamma\delta$ T-Zellantwort gegen „Phospholiganden“ und Daudizellen auf der einen und K562 auf der andere Seite wohl zwei grundsätzlich verschiedene Aktivierungsmechanismen eine Rolle spielen (Bukowski et al., 1994; Ferrarini et al., 1995). Zudem konnten Bukowski und Mitarbeiter zeigen, daß durch Gentransfer eines $V\gamma9V\delta2$ T-Zellrezeptors in eine TCR-negative T-Zelllinie sich diese durch mycobakterielle Lysate oder synthetisches Monoethylphosphat stimulieren läßt (Tanaka et al., 1994; Bukowski et al., 1995). In diesem Zusammenhang ähnelt die Stimulation durch die „Phospholiganden“ derjenigen durch bakterielle Superantigene wie z. B. dem *Staphylococcus aureus*-Enterotoxin B (SEB). Doch anders als bei der Stimulation von $\alpha\beta$ T-Zellen durch Superantigene, die außerhalb des Peptidbindungsspaltes direkt an die V-Region des T-Zellrezeptors binden, scheinen bei $\gamma\delta$ T-Lymphozyten die N- und J-Verknüpfungsregionen für die Antigenerkennung eine wichtige Rolle zu spielen. Bukowski und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Substitution zweier Aminosäuren in der von der N-Region der γ -Kette codierten CDR3-Schleife die Spezifität für verschiedene „Phosphoantigene“ qualitativ und quantitativ beeinflusst (Bukowski et al., 1998).

Zusammengenommen geben diese Ergebnisse zwar überzeugende Hinweise darauf, daß die „Phospholiganden“ direkt mit dem $\gamma\delta$ TCR interagieren. Ob die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ihre Antigene, ähnlich den Immunglobulinen, direkt erkennen, in die Zelle aufnehmen oder auf die Präsentation durch Oberflächenmoleküle (Hitzeschockproteine, nicht-klassische MHC-Moleküle oder weitere, noch unbekannte Rezeptoren) angewiesen sind, ist aber weiterhin nicht endgültig beantwortet. Ebenso offen bleibt die Frage nach notwendigen kostimulatorischen Signalen.

1.7. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rattensystem, speziell das RT1B^l-Molekül, benutzt. Es sollte die Interaktion des Ratten MHC Klasse II Moleküles RT1B^l und des von ihm präsentierten Autoantigens basische Myelinprotein (MBP) mit autoreaktiven TCR charakterisiert werden. Von besonderem Interesse war dabei die Interaktion mit dem TCR 35/1, der typisch für TCR ist, die in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) der LEW Ratte vermehrt zu finden sind. Zu diesem Zweck wurde versucht, lösliche MHC Klasse II -artige Moleküle herzustellen und ihre Peptid- und TCR-Bindung bestimmt. Weiterhin sollten MHC Klasse II Konstrukte, die mit einem antigenen Peptid kovalent verbunden sind, generiert, in verschiedenen Zellen exprimiert und ihre T zellstimulatorische bzw. immunmodulatorische Kapazität *in vitro* und *in vivo* getestet und mit einer RT1B^l Mutante verglichen werden. Ebenfalls wurde im Rahmen einer Kooperation begonnen, RT1B^l-Tetramere zu generieren.

Um Aufschluß über die relevanten Bereiche der Erkennung diverser Superantigene des TCR zu erhalten, sollte der TCR 35/1, sowie TCR mit mutierten CDR der TCR- β -Kette in Ratten CD28 positiven T-Zelllinien exprimiert und in der Aktivierung durch unterschiedliche Liganden charakterisiert werden.

Hierzu diene das in der EAE der Lewisratte präferentiell exprimierte T-Zellrezeptorgen BV8S2 (V β 8.2) im Vergleich mit dem hoch homologen BV8S4 Gensegment.

Schließlich sollte geklärt werden, inwieweit die Expression von CD28 die für die Aktivierung von $\gamma\delta$ TCR transduzierten T-Zelllinien durch $\gamma\delta$ TCR Liganden essentiell ist.

2. Material

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose ultra pure	Gibco/BRL GmbH
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
ELISA-Platten (Nunc-Maxisorp)	Nunc GmbH
Ethanol	Ferak, Berlin
Ethidiumbromid	Sigma Chemie
FACS Röhrchen	Greiner Labortechnik
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL GmbH
Glucose	Ferak, Berlin
Glycerin	Ferak, Berlin
³ H-Thymidin	Amersham Buchler GmbH
HEPES	Sigma Chemie GmbH
Ionomycin	Sigma Chemie GmbH
IPTG	Sigma Chemie GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Eppendorf Gerätebau
LB-Nährmedium	Gibco/BRL GmbH
2-Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Ferak, Berlin
PCR-Mineralöl	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycinlg.	Gibco/BRL GmbH
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMA	Sigma Chemie GmbH
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Kulturmedium	Gibco/BRL GmbH

Triton X-100	Sigma Chemie GmbH
Trypanblau	Sigma Chemie GmbH
Einmalspritzen	Nenke-Sass-Wolf GmbH
Gewebekulturflaschen	Nunc GmbH, Greiner
GlasfilterMatten	Pharmacia GmbH
Mikrotiterplatten (96-Napf) Rundboden	Nunc GmbH
Mikrotiterplatten (96-Napf) Flachboden	Costar, Cambridge, USA
Multischale (24-Napf)	Nunc GmbH
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen „crystal“	Eppendorf Gerätebau
Petrischalen (60x15mm)	Nunc GmbH
Plastikpipetten	Greiner Labortechnik
Plastikreaktionsgefäße	Eppendorf Gerätebau
SDS	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter	Millipore, Frankreich
Szintillationsflüssigkeit für „Betaplate II“	Pharmacia GmbH
Zentrifugenröhrchen, 15ml	Greiner Labortechnik
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Greiner Labortechnik

2.1. Lösungen, Puffer und Nährmedien

Ampicillin	100mg/ml in H ₂ O bidest steril filtrieren und in Aliquots bei -20°C aufbewahren
BSS (balanced salt solution)	BSS I und BSS II institutseigene Herstellung BSS I: 50g Glucose; 3g KH ₂ PO ₄ ; 1,9g Na ₂ PO ₄ ;

	0,5g Phenolrot; ad 1l H ₂ O bidest.
	BSS II: 9,25g CaCl ₂ ; 20g KCl; 320g NaCl; 10g MgSO ₄ ad 1l H ₂ O bidest.
BSS/BSA	BSS mit 0,2% BSA
BSS/FCS	BSS mit 5% FCS
DMEM	MEM von Gibco/BRL Glutamax; 25mM HEPES; Pyridoxin
DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O bidest. Nach Zugabe über Nacht stehenlassen und dann autoklavieren
2x HBS	50mM HEPES pH7,05; 10mM KCl; 12mM Glucose; 280mM NaCl; 1,5mM Na ₂ HPO ₄
Einfriermedium	50% RPMI ⁺ , 10% DMSO, 40% FCS
Ethidiumbromidlsg.	10 mg/ml in H ₂ O bidest.
Gel-Ladepuffer	0,5% Bromphenolblau 0,5% Xylencyanol 50% Glycerin, 10mM EDTA

LB-Medium	20g LB Broth Base auf 1l H ₂ O aufgefüllt, autoklaviert
LB-Agar	1l LB-Medium; 15g Agar autoklavieren; Ampicillin (20µg/ml) zugeben, in Petrischalen gießen
PBS (phosphate buffered salt solution)	institutseigene Herstellung 0,2g KCl; 0,2g KH ₂ PO ₄ ; 0,05g MgCl ₂ ; 8g NaCl; 1,15g NaHPO ₄ ; ad 1l H ₂ O bidest.
PBS/BSA/Azid	PBS mit 0,2% BSA und 0,02% NaN ₃
RPMI ⁺ (Gibco/BRL)	Gewebekulturmedium RPMI 1640; je 100ml supplementiert mit 5ml FCS; 1ml Natriumpyruvat, 100fach konz.; 1ml nicht essentielle Aminosäuren, 100fach konz.; 1ml Pen./Strep., 100fach konz.; 2µl Mercaptoethanol; 29,2mg Glutamin

Source 30Q	Anionen-Austausch Medium für die Chromatographie Pharmacia
TBE-Puffer (10fach)	108g Tris; 55g Borsäure; 40ml EDTA (0,5M), pH 8,0
Trypanblaulsg.	0,04% Trypanblau in PBS/BSA/Azid
Superdex 75	Gelfiltrationsmedium, Pharmacia

2.2. Enzyme und Inhibitoren

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Biolabs
Reverse Transkriptase, Superscript™ II	Gibco/BRL GmbH
RNase A	Sigma Chemie GmbH
RNase-Inhibitor	Gibco/BRL GmbH
T4 DNA Ligase	Stratagene, Heidelberg
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Platinum PFX-Polymerase	Invitrogen, Leek, NL
PMSF	Sigma Chemie GmbH
Leupeptin	Sigma Chemie GmbH

2.3. Reagenzkits

Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden
pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy Kit	Quiagen, Hilden
TOP 10F' One Shot™ Kit	Invitrogen, Leek, NL
TOPO-Cloning Kit	Invitrogen, Leek, NL
Quickchange-Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
OptEIA-ELISA-Kit (IL-2)	Pharmingen

2.4. Monoklonale Antikörper

<u>mAk:</u>	<u>Antigen bzw. pos. Zellen:</u>	<u>Referenz:</u>
OX-6	RT1B (MHC der Ratte)	McMaster und Williams, 1979
R78	Ratte TCR β -V8.2 in LEW	Torres-Nagel, Gold et al., 1993
V65	Ratte $\gamma\delta$ TCR	Kühnlein, Park et al., 1994
Pan $\gamma\delta$	humaner $\gamma\delta$ -TCR	Kabelitz et al., 1991
R73	Ratte $\alpha\beta$ -TCR	Hünig, Wallny et al., 1989
L180	Schaf LFA-1	Hünig, 1985
JJ319	α CD28 der Ratte	Tacke et al., 1995
CD3	CD3 ϵ -Kette	Leo et al., 1987

2.5. Sonstige serologische Reagentien

Esel anti-Maus Immunglobulin (D α MIg)	Dakopatts, Dänemark
Normales Maus Ig	Dakopatts, Dänemark
Streptavidin 670 Cy Chrome	Pharmingen

2.6. Nukleinsäuren und Oligonukleotide

Desoxyribonukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Heidelberg
Oligo dT15 Primer	Promega, Heidelberg

2.6.1. Primer für PCR und Sequenzierung

RT1B¹ für retroviralen Vektor SFG S-65T:

α -Kette:

sense 5` - CCG CTC AGC AGA GCT CTG -3`

antisense 5` - CCC GGA AGA TCT TCA AAG GGG CCC TGG GTG TC -3`

β -Kette:

sense 5` - CCC ATG CCA TGG CTC TGC AGA CCC CC -3`

antisense 5` - CGC GCGGAT CCT CAC TGT AGG CCT GCT GG -3`

kovalent gebundenes MBP₇₁₋₉₀ an der RT1B¹- β -Kette:

5` - GGG CTA GCT AGC GGA GGG GGC GGA AGC GGC GGA GGG AGA GAC
TCC CCA AGG G -3`

5` - CGC GCG GAT CCT CAC TGT AGG AGC CCT GCT GG -3`

5` - CCC ATG CCA TGG CTC TGC AGA CCC CC -3`

5` - CCC CTA GCT AGC GAA GAA GTG GAC TAC TGG GTT TTC ATC TTG GGA CCT
CTG CGA CTT CTG GGG CAG GCC CTC AGT CCC TGG GC -3`

$\beta_1\alpha_1$ -Domänen-Konstrukt von RT1B¹:

5` - GGA ATT CCA TAT GGG CAG AGA CTC CCC A -3`

5` - TCT TGA CCT CCA AGC CGC CGC AGG GAG GTG -3`

5` - CGG CGG CTT GGA GGT CAA GAC GAC ATT GAG G -3`

5` - TCG GAA GAT CTT TAG TTG ACA GCT TGG GTT GAA TTT G -3`

Sequenzierprimer:

Für retroviralen Vektor SFG-S65T:

5` - CAA AGT AGA CGG CAT CGC AGC TTG -3`

5` - TGA TAT TGT TGA GTC AAA ACT AGA GC -3`

Für Proteinexpressionsvektor pET-3a:

5` - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3`

5` - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3`

Für Subklonierungsvektor pCR2.1:

5` - GTA AAA CGA CGG CCA G -3`

5` - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3`

Mutationsprimer (M38V der RT1B¹ α -Kette):

5` - CCC ATG CCA TGG CTC TGC AGA CCC CCA GCT TCC TCC TC -3`

5` - GAG GAG GAA GCT GGG GGT CTG CAG AGC CAT GGC ATG GG -3`

Singlechain-Konstrukt von RT1B¹:

β -Kette:

5` - GAG ATG GCT CTG CAG ACC -3`

5` - GGG CCT CCG GAA CCA CCA CCG CCG CTG CCA CCG CCA CCA CTA GTC
CGC CAC TCC AGT GAC GGG-3`

α -Kette:

5` - TCA AAG GGG CCC TGG TGT C-3`

5` - CCC GGT CCG GAG GCG GCG GTT CTG GCG GTG GCG GTT CCT CGA GTG
GAG GTC AAC GAC ATT GAG GCC- 3`

Humane $\gamma\delta$ -Ketten:

γ_9

5` - CTG TCA CTG CTC CAC GCA TCA AC -3`

5` - GGA AGA TCT TTA TGA TTT CTC TCC TCC ATT GCA GCA -3`

δ_2

5` - CAG AGG ATC TCC TCC CTC ATC CAT -3`

5` - CGC GGA TCC TTA CAA GAA AAA TAA CTT GGC AGT C -3`

2.7. Zellen

P815 MHC Klasse II negative Maus Mastrozytomlinie der DBA/2 Linie.
(Ralph et al.. J.Exp.Med. 143:1528) ATCC#TIB-64

P80 MHC Klasse II negative B7 transduzierte P815 Maus Mastrozytomlinie
der DBA/2 Linie. (Dunn and Potter, J. Nat. Cancer Institute 1957.
18:587)

- J.RT3-T3.5 Ursprünglich JM genannte Linie; TCR β -Kette defiziente Mutante der Jurkat Leukemie Zelllinie. Sie exprimiert auch kein Oberflächen CD3. (Ohashi et al., Nature 1985. 316:606)
ATCC#TIB-153
- Raji Lymphoblasten ähnliche Linie 1963 isoliert aus einem Burkitt Lymphom. (Pulvertaft et al., Lancet 1964. 1 :238)
ATCC#CCL-86
- M12.4.1.C3 MHC Klasse II negative Subzelllinie der B-Zell Lymphomlinie M12. (Griffith et al., J. Exp. Med. 1988. 167(2) : 541-555 und Kim et al., J.Immunol. 1979. 122:1549)
- 293T ursprünglich als 293tsA1609neo bezeichnete Zelllinie. Verpackungszelllinie für retrovirale Transfektion. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Lindemann, Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg.
ATCC#CRL11268
- 58 $\alpha^- \beta^-$ $\alpha\beta$ Tcr-negatives Derivat des Maus T-Zellhybridoms Do-11.10.7 (BW5147xA^k reaktive T-Zellen); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr.Ed Palmer, Basel Institut for Immunology (Letourneur, F. und B. Mallisen, Eur. J. Immunol. 1989.19:2269-2274)
- Cl-3 Zelllinie zur Testung der IL-2 Produktion. Il-2 abhängige, Ag unabhängige CTL-Linie (Mitteilung von Prof.Hünig)

2.8. Bakterienstämme

TOP 10F'	One Shot™TOP 10F' kompetente Zellen, Invitrogen, Leek, Niederlande.
XL-1 Blue	Epicurian Coli XL-1 Blue MRF' Kan superkompetente Zellen. Stratagene, Heidelberg
BL21DE3	kompetente Bakterien für die Expression rekombinanter Proteine, Novagen, Madison

2.9. Vektoren

pCR 2.1	Subklonierungsvektor des TOPO Kits, der das Enzym Topisomerase bereits an seinen linearisierten Enden kovalent gebunden trägt. Invitrogen, Leek, NL.
pET-3a	Proteinexpressionsvektor, bei dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors liegt. Novagen, Madison
SFG-GFP (S65T)	enthält Green Fluorescence Protein (GFP) Buehler H. und R. C. Mulligan. 1996. Mol. Med. 2:545-555.
pVSV-G	pCZVSV-G wt, enthält <i>env</i> von Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Yee J.-K., Friedmann T., und J. C. Burns. Methods in Cell Biology, 1994, 43:99-112.

-
- pHIT-60 pHIT-60-CMV-MVV-gag-pol-SV40 ori.
Enthält *gag* und *pol* aus Moloney leukemia Virus
(MoMLV) unter Kontrolle des humanen
Cytomegalovirus (CMV)- Promotors.
(Soneoka et al., Nucleic Acid Res. 1995. 23:628)
- SFG- α -TCR SFG Vektor, der die TCR α -Kette des T-Zellhybridoms 35/1 (Fusion
aus MBP13, freundlicherweise von Dr. Gold, Neurologische Klinik
Würzburg zur Verfügung gestellt, und
58 α β) anstelle des GFP besitzt (Asmuß et al., JI 1996, 157:4436).
- SFG- β -TCR SFG Vektor, der die TCR β -Kette des T-Zellhybridoms 35/1 (Fusion
aus MBP13, freundlicherweise von Dr. Gold, Neurologische Klinik
Würzburg zur Verfügung gestellt, und
58 α β) anstelle des GFP besitzt (Asmuß et al., JI 1996, 157:4436).
- pczCFG IZ Derivat des pEYZ/MCS Vektors (Kuss et al., EJI 1999, 29:3077), der
ein chimäres CD28-Molekül enthält, bestehend aus einem
extrazellulären Rattenanteil und einem transmembranen / intrazellulären
Mausanteil (persönliche Mitteilung von Dr. Lühder).
- pczCFG 512 Derivat des pEYZ/MCS Vektors (Kuss et al., EJI 1999, 29:3077), der
ein humanes CD28-Molekül enthält (persönliche Mitteilung von Dr.
Dennehy).

2.10. Molekulargewicht-Marker (DNA-Marker)

100 bp-Leiter (10 DNA-Fragmente)

MBI Fermentas

(1000bp, 900bp, 800bp, 700bp, 600bp, 500bp,
400bp, 300bp, 200bp, 100bp)

1 kb-Leiter (12 DNA-Fragmente)

MBI Fermentas

(10000bp, 8000bp, 6000bp, 5000bp, 4000bp,
3500bp, 3000bp, 2500bp, 2000bp, 1500bp, 1000bp, 500bp)

2.11. Proteinmarker

Niedrigmolekulargewichtsmarker

Biorad

2.12. Peptide

MBP₆₈₋₈₈: H-YGSLPQKSQRSQDENPVVHF-OH

Biotrend, Köln

OVA₃₂₃₋₃₃₉: H-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH

Biotrend, Köln

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Arbeiten mit Bakterien

3.1.1.1. Übernachtskultur

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien und zum Anlegen von Dauerkulturen dieser Bakterien wurden Übernachtskulturen angesetzt. Dazu wurden 3ml LB-Medium entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit 10 μ l einer Glycerin-Dauerkultur beimpft. Für größere Ansätze wurden 500ml Bakterien-Medium mit 0,5ml einer 3ml Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde in 15ml Reagenzröhrchen bzw. in 1l Erlenmeyerkolben auf einem Certomat-Bakterienschüttler bei 37°C mit 180rpm über Nacht inkubiert.

3.1.1.2. Dauerkultur

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden sogenannte Master-Agarplatten oder Glycerindauerkulturen angelegt. Die Herstellung von Masterplatten erfolgte durch Ausstreichen von Einzelkolonien aus Bakterienplatten mit sterilen Impfösen auf eine frische Agarplatte. Die so angeimpften Platten wurden für eine Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Die Bakterien können unter diesen Bedingungen bis zu zwei Monaten gehalten werden.

Glycerinkulturen wurden durch Mischen von 0,5ml sterilem Glycerin (87%) mit 0,5ml frischer Übernachtskultur hergestellt und in Gefrier Röhrchen überführt. Glycerindauerkulturen können bei -70°C für mehrere Jahre gelagert werden.

3.1.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

3.1.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien wurden bei -140°C in einer Tiefgefriertruhe aufbewahrt. Um die Bildung von zellzerstörenden Eiskristallen beim Einfrieren weitgehend zu vermeiden, wurden 10^7 sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindende Zellen in Einfriermedium (RPMI bzw. DMEM, 10% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen auf -80°C gebracht und dann auf -140°C überführt. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden sie bei 37°C schnell aufgetaut, sofort in ein möglichst großes Volumen BSS/BSA in einem Zentrifugenröhrchen überführt und 5min. bei 1600rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und im Brutschrank kultiviert.

3.1.2.2. Kultivierung von Zellen

Frisch präparierte Zellen, sowie alle Zelllinien (mit Ausnahme von 293T-Zellen) wurden in RPMI⁺ bei 37°C und 6% CO_2 in einer H_2O -gesättigten Atmosphäre in üblichen Plastik-Zellkulturgefäßen kultiviert. 293T-Zellen wurden in DMEM⁺ für maximal 30 Passagen gehalten.

Zur Expansion und Passagierung von Suspensionszellen wurden diese mit einer Pipette resuspendiert und in einem geeigneten Volumen in ein neues Kulturgefäß mit Medium transferriert. Adhärente Zelllinien wie 293T wurden mit einem kleinem Volumen ATV-Lösung bedeckt und die Ablösung der Zellen im Mikroskop verfolgt. Bei erfolgtem Übergang in Suspension wurden die Zellen in BSS/BSA überführt, 5min. bei 1600rpm pelletiert und in entsprechendem Medium resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Lebend-Zellzahl anhand einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblaulösung.

3.1.2.3. Immunfluoreszenzen und Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Anhand der Durchflußzytometrie kann die Expression von zellulären Oberflächenantigenen quantitativ erfasst werden. In dem hierzu verwendeten FACScan II-Gerät werden die Zellen durch einen Laserstrahl geleitet und dabei Farbstoffe, die über Antikörper an die Zelle gekoppelt sind, zur Fluoreszenz angeregt. Neben drei verschiedenen Lichtwellenlängen kann das Gerät die Größe der Zellen über den sogenannten „Forward Scatter“, die Ablenkung des Laserstrahls vorwärts und die Granularität der Zellen über den „Side Scatter“, die seitliche Streuung des Lasers, messen.

Für gewöhnlich wurden 5000 Zellen gemessen, wobei mit Hilfe eines virtuellen Fensters („gate“) ausschließlich lebende Zellen berücksichtigt wurden. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde anhand der Parameter Größe und Granularität getroffen. Die Analyse der aufgenommenen Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Lysis II™ und CellQuest™. Die Daten wurden, nach Speicherung, als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale Dot-Plots dargestellt.

Für die Färbungen wurden die mAk in austitrierten, gesättigten Konzentrationen eingesetzt. Pro Ansatz wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen gefärbt.

Das Färbeprotokoll variiert mit der Anzahl der verwendeten Antikörper:

A. Analyse eines Oberflächenantigens mittels der Einfarbenimmunfluoreszenz mit direkt konjugierten Antikörpern:

1. Zugabe des ersten Antikörpers (FITC(=Fluoresceinisothiocyanat)- oder PE(=Phycoerythrin)- konjugiert)
2. 1x waschen und dann Analyse

B. Analyse eines Oberflächenantigens mittels der Einfarbenimmunfluoreszenz mit indirekt konjugierten Antikörpern:

1. Zugabe des unkonjugierten ersten Antikörpers
2. 1x waschen

3. Zugabe des mit Farbstoff-gekoppelten sekundär Antikörper (gegen Immunglobulin: DaMIgPE)
4. 1x waschen und Analyse

C. Analyse von zwei Oberflächenantigenen mittels der Zweifarbenimmunfluoreszenz:

1. wie Schritte 1-3 in B
2. 1x waschen
3. Zugabe von NMIg (=Normales Maus Ig) zur Blockierung freier Bindungsstellen an D α MIgPE
4. Zugabe des FITC-konjugierten zweiten Antikörpers
5. 1x waschen und Analyse

D. Analyse von drei Oberflächenantigenen mittels der Dreifarbenimmunfluoreszenz:

1. wie Schritte 1-3 in B (beide AK direkt konjugiert, FITC und bio)
2. 1x Waschen
3. Zugabe des unkonjugierten dritten AK
4. 1x Waschen
5. Zugabe von NMIg
6. Zugabe von D α MIg-PE
7. 1x waschen und Analyse

Die einzelnen Antikörper wurden jeweils für 15 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden überschüssige Antikörper durch waschen mit je 3ml PBS/BSA/Azid-Lösung und anschließender Zentrifugation für 7min bei 1600rpm entfernt.

3.1.2.4. Anreicherung durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACSort)

Zur Anreicherung bestimmter Zellpopulationen dient der Zellsort.

Hierbei wird der unter 3.1.2.2. beschriebenen Immunfluoreszenzanalyse mittels FACScan die Sortierung der analysierten Zellen nachgeschaltet. Die Durchflußgeschwindigkeit des Durchflußzytometers ist so eingestellt, daß sich in jedem den Laserstrahl passierenden Tropfen nur eine Zelle befindet. Weist diese Zelle die durch an sie gekoppelte, Farbstoffe tragende Antikörper sichtbar gemachten Oberflächenantigene der gewünschten Zellpopulation auf, wird der Tropfen in ein Sammelgefäß umgelenkt. Sollen die angereicherten Zellen wieder in Kultur genommen werden, müssen die eingesetzten Antikörper steril und frei von Na-Azid sein und sterile Bedingungen eingehalten werden.

Zunächst wurde im FACS der Prozentsatz der Zellen, die angereichert werden sollten, bestimmt und damit eine sinnvolle Zellzahl für den Sort ermittelt. Die zu sortierenden Zellen wurden möglichst in logarithmischer Phase geerntet, gezählt und in möglichst kleinem Volumen ($1-5 \times 10^6$ Zellen/100 μ l) entsprechend dem Protokoll für Immunfluoreszenzen (3.1.2.2) mit Ak inkubiert. Nach beendeter Färbung wurde der Ak-Überschuss mit PBS/1%BSA gewegewaschen und die Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml in PBS/0,1%BSA eingestellt.

Die Sortierung erfolgte direkt in für die Zellen geeignetes Kulturmedium. Nach zweimaligem Waschen wurden die angereicherten Zellen sofort in Kultur in einem Medium mit doppelter Antibiotikakonzentration genommen.

3.1.2.5. Anreicherung durch MACS-Sort

Bei dieser Methode werden die Zellen über magnetische Kügelchen, die an ihrer Oberfläche die entsprechenden Antikörper gebunden haben, aufgereinigt. Die entsprechenden Kügelchen und der Magnetständer waren dabei von Miltenyi Biotec, USA. Es wurden jeweils maximal 1×10^8 Zellen gereinigt, die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

3.1.2.6. Einzelzellklonierung durch Grenzverdünnung („limiting dilution“)

Um sicherzustellen, daß jedes in Kultur genommene Hybridom aus einer Einzelzelle hervorgegangen ist, wurden die Zellen stark verdünnt und theoretisch 0,3 Zellen pro Napf ausgesät. Wenn in maximal 30% der Näpfe Zellen wuchsen, konnte statistisch angenommen werden, daß in jeden dieser Näpfe nur eine Zelle pipettiert worden war.

3.2. Molekularbiologische Methoden

Alle im weiteren Verlauf beschriebenen Standardbedingungen beziehen sich auf Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989: Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory, New York. Andere Quellen sind vermerkt.

3.2.1. Gelelektrophorese

Agarosegele eignen sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 400-20.000 Basenpaare. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte, in Abhängigkeit von deren erwarteter Größe, in 1-2%igen Agarosegelen mit TBE-Puffer:

<u>Prozent Agarose</u>	<u>erwartete DNA-Länge</u>
0,6	20kb-2,0kb
0,8	10kb-1,0kb
1	8kb-0,5kb
1,5	3kb-0,2kb
2	2kb-0,1kb

Die Gele wurden durch Aufkochen der Agarose in Wasser hergestellt. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurde zehnfach konzentrierter TBE-Laufpuffer so zugegeben, daß die Endkonzentration im Gel 1xTBE betrug. Nach Zugabe von 1µl/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10mg/ml) wurde die Agaroselösung in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Gelladepuffer (0,5% w/v Xylencyanol, 50% Glycerin, 10mM

EDTA) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der 100bp- und der 1kb-Marker. Der Laufpuffer entsprach in seiner Konzentration dem Gelpuffer (1xTBE). Die DNA wurde bei 5-10V/cm Gellänge aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäurefragmente, die nach Bestrahlung mit UV-Licht, Licht in sichtbarer Wellenlänge (orange) aussenden.

3.2.2. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und unter Verwendung einer UV-Handlampe ($\lambda=366$) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gewicht des ausgeschnittenen Agaroseblöckchens wurde auf einer Feinwaage bestimmt und die DNA mit dem Qiagen Gel-Extraction-Kit nach den Angaben des Herstellers eluiert.

3.2.3. Restriktionsenzym-Reaktion

Zur Spaltung von 1 μ g DNA wurden etwa 1-1,5U Restriktionsenzym eingesetzt, wobei die Pufferbedingungen nach den Herstellerangaben gewählt wurden. Das Reaktionsvolumen richtete sich nach der Menge an zuspaltender DNA, wobei 1 μ g DNA etwa in einem Volumen von 10 μ l verdaut wurde. Die Inkubationszeit betrug bei Reaktionsansätzen im analytischen Maßstab (<1 μ g DNA) 2-3 Stunden, bei präparativen Ansätzen wurde länger, meist über Nacht inkubiert. Doppelspaltungen wurden, sofern es die Pufferbedingungen zuließen, in einem Ansatz durchgeführt.

Bei bestimmten Restriktionsenzymen mußte darauf geachtet werden, daß das Enzymvolumen nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betrug, da hohe Glycerinkonzentrationen aus dem Enzymaufbewahrungspuffer zur sogenannten Staraktivität von Enzymen, d.h. zur zusätzlichen Hydrolyse einer alternativen Schnittstelle, führen können.

Die Ansätze wurden in der Regel folgendermaßen zusammengestellt:

10x Reaktionspuffer	3µl
DNA	xµl
Restriktionsenzym	yµl
mit H ₂ O ad	30µl

Die Inkubation erfolgte stets beim Temperaturoptimum des jeweiligen Restriktionsenzym. Am Ende der Reaktion wurde ein Aliquot (etwa 100ng) entnommen und die Probe in einem Agarosegel auf Vollständigkeit der Spaltung überprüft.

3.2.4. Isolation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des RNeasy-Kit von Quiagen durchgeführt. Dieser Kit ermöglicht die schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus kleinen Zellmengen ohne Phenol-Chloroform-Extraktion. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Zellen in Denaturierungslösung homogenisiert und dieses Homogenisat auf eine Säule aufgetragen. Die RNA wurde an die in der Säule enthaltene Matrix gebunden und nach einem Waschschrift eluiert. Da auch andere Nukleinsäuren an diese Matrix binden können, wies die isolierte RNA oft eine Kontamination mit genomischer DNA auf, die durch die Behandlung mit RNase-freier DNase beseitigt werden konnte.

3.2.5. Isolation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde LB-Medium (+100µg Ampicillin/ml) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterenschüttler bei 180rpm inkubiert. Bei größeren Bakterienkulturen (>250ml) wurde zunächst 1/10 Volumen des Mediums angeimpft, 5h bei 37°C geschüttelt und diese Vorkultur über Nacht mit dem restlichen LB-Medium inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500µl der Kultur mit der gleichen Menge an 96%igem Glycerin gemischt und als Reserve in Eppendorfcaps bei -20°C gelagert.

3.2.5.1. Großpräparation mit Hilfe des Quiagen-Maxi-Kit

Bei dieser schnellen Methode zur Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde, gemäß dem Herstellerprotokoll, das Bakterienlysate auf eine Säule geladen, die enthaltene Plasmid-DNA dort an eine Filtermatrix gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Um ein Überladen der Säule zu vermeiden, wurde bei highcopy-Plasmiden (z.B. pCR-Script) nur 250 ml Bakterienkultur eingesetzt.

3.2.5.2. Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab über Promegasäulen (nach Boom et al, 1990)

Diese Methode ermöglicht die gleichzeitige Präparation sehr vieler Ansätze unter Vermeidung der Phenol-Chloroform-Extraktion.

1,5ml Bakterienkultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (2min, 13000rpm), in 150µl Lösung I resuspendiert und der Ansatz nacheinander mit 150µl Lösung II und 150µl Lösung III gemischt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13000rpm wurde der Überstand mit 900µl Puffer L6 und 50µl Diatomeen-Lösung vermischt, 5min bei RT inkubiert und auf eine an Vakuum angeschlossene Promegasäule gegeben. Die Silikatpartikel der Diatomeen-Lösung wurden auf der Kunststofffritte der Säule gesammelt, mit 3ml Wasch-

Lösung gewaschen und durch kurze Zentrifugation von Ethanolresten befreit. Anschließend wurde die an die Silikatpartikel gebundene Plasmid-DNA mit 50µl Aqua dest. eluiert.

3.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.6.1. Standard-PCR mit doppelsträngiger (ds) DNA

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (= Polymerase Chain Reaction, PCR) können unter Beteiligung einer DNA-Polymerase und zwei gegeneinandergerichteten Oligonukleotid-Primern spezifisch DNA- bzw. cDNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die Primer sind so gewählt, daß sie komplementär zu kurzen Abschnitten an den Enden der jeweiligen DNA-Sequenz sind.

Nach Denaturierung der DNA hybridisieren diese Primer antiparallel an je einen DNA-Strang. In der nachfolgenden Reaktion verlängert die DNA-Polymerase die DNA-Matrize, so daß ein neuer DNA-Strang entsteht. Im nächsten Zyklus werden die Vorgänge wiederholt und so kann in kurzer Zeit eine bestimmte DNA-Sequenz exponentiell vermehrt werden, weil die neu synthetisierten DNA-Stränge im nächsten Zyklus selbst wieder als Matrize dienen.

Die PCR-Reaktionen wurden in speziellen, dünnwandigen 0,5ml Mikro-reaktionsgefäßen in einem Perkin-Elmer Thermocycler 480 durchgeführt.

Für die Amplifikationen wurden 0,125U *Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) in einem 25µl Reaktionsansatz eingesetzt.

Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1pg-1ng	ssDNA oder dsDNA
1µl	Nukleosidtriphosphatmix (je 2,5mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
50ng	Oligonukleotide
2,5µl	10x Reaktionspuffer (MBI Fermentas)
0,5µl	50mM MgCl ₂
0,125µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1U/µl, MBI Fermentas)

Das Volumen wurde mit Aqua dest. auf 25µl eingestellt, mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet und bis zur Überführung in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler auf Eis gestellt.

Die Amplifikation bestand aus folgenden Schritten: Nach einmaliger, vollständiger Denaturierung der DNA (94°C, 4min) folgten 25-35 Zyklen mit Denaturierung (1min, 94°C), Hybridisierung (1min, Hybridisierungstemperatur) und Verlängerung (1min, 72°C). Die Verlängerungszeit erhöhte sich bei jedem Zyklus um eine Sekunde. Nach abschließender Inkubation für 10min bei 72°C wurden 5µl jedes PCR-Ansatzes zusammen mit geeigneten Markern auf ein Agarosegel aufgetragen und die Größe der amplifizierten PCR-Produkte bestimmt. Die Oligonukleotid-spezifische Hybridisierungstemperatur T_m errechnete sich, je nach Oligonukleotid, annäherungs-weise mit der Gleichung:

$$T_m = ((G/C \times 4^\circ\text{C} + (A/T) \times 2^\circ\text{C}) - 2^\circ\text{C})$$

Traten unspezifische PCR-Produkte auf, so wurde diese Ausgangstemperatur schrittweise um 1°C erhöht, bis das spezifische PCR-Produkt deutlich dominierte.

3.2.6.2. RT-PCR

Hierbei wurde die in der Gesamt-RNA enthaltene Poly A (+)-RNA durch reverse Transkription mit einem phosphorylierten oligo dT-Primer und dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann in eine nachfolgende PCR-Reaktion eingesetzt.

Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

8µl	5x Transkriptionspuffer (250mM Tris-HCl, pH8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl ₂)
4µl	Nukleosidtriphosphatmix (je 2,5mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
2µl	Oligo dT15-Primer (100ng/µl)
1µl	DTT (100mM)
1µl	RNasin (1U/µl)
0,5µl	Superscript™ Reverse-Transkriptase II (200U/µl)
1-2µg	Gesamt-RNA

Der Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 40µl aufgefüllt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung des oligo dT-Primers an die Poly A (+)-RNA zu gewährleisten. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte für eine Stunde bei 37°C, gefolgt von einer 5 minütigen Hitzeinaktivierung bei 95°C.

1µl dieser Transkription wurde in der nachfolgenden PCR (3.2.6.1) pro Reaktionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 1µl der in die reverse Transkription eingesetzten Gesamt-RNA anstatt der erhaltenen cDNA pipettiert, um ein falsch-positives Signal durch eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen.

3.2.6.3. Reinigung von PCR-Produkten

Alle PCR-Produkte wurden mit dem QuickSpin-PCR-Purification-Kit von Quiagen gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Hierbei wurden je nach Stärke der Gelbande ca.30-60µl genommen.

3.2.7. Klonierungen

3.2.7.1. Vorbereiten des Vektors

Je nach Klonierungsstrategie wurden Endonukleasen mit Schnittstellen in der „multiple cloning site“ ausgewählt, die entweder 3'- oder 5'-Überhänge („sticky ends“), oder glatte Enden ohne Überhänge („blunt ends“) bilden.

10-30µg des Vektors wurden mit den gewählten Restriktionsenzymen gemäß den Herstellerangaben inkubiert und der vollständige Verdau des Plasmids durch Auftragen eines Aliquots des Ansatzes auf ein analytisches Agarosegel kontrolliert. Anschließend wurden die neuen Enden durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (20min., 37°C) dephosphoryliert, um eine Rückligation des Plasmids mit sich selbst zu verhindern. Der gesamte Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert.

3.2.7.2. Vorbereiten des Inserts

In allen Experimenten wurden gereinigte PCR-Produkte in die vorbereiteten Plasmide kloniert. Die Klonierung über „blunt end“ ist unter 3.2.7.1. beschrieben.

Geeignete Schnittstellen für „sticky end“-Klonierungen wurden durch spezielle Primer an das PCR-Produkt angefügt: Neben der spezifischen Sequenz enthalten diese Primer am 5'- bzw. 3'-Ende die Erkennungssequenz für ein oder zwei geeignete Restriktionsenzyme, gefolgt von 3-5 unspezifischen Nukleotiden. Diese Nukleotide erleichtern im nachfolgenden Verdau die Bindung des Restriktionsenzym an das PCR-Produkt und damit die vollständige Modifizierung der Enden.

Die verdauten PCR-Produkte wurden nochmals mit dem QuickSpin-Purification-Kit (3.2.6.3.) gereinigt, die Konzentration der DNA im Agarosegel durch Vergleich mit DNA-Fragmenten eines aufgetragenen Markers abgeschätzt und gegebenenfalls durch Präzipitation mit Ethanol höher konzentriert.

3.2.7.3. Ligation

Vektor-DNA und Insert wurden bei „blunt end“-Klonierungen in einem molaren Verhältnis von 1:10, bei „sticky end“-Klonierungen von 1:5 eingesetzt. Diese DNA-Menge wurde mit 2µl 5x Ligationspuffer (250 mM Tris-HCl pH7,6; 50mM MgCl₂, 5mM ATP; 5mM DTT; 25% PEG 8000) und 1µl HC-DNA-Ligase (30U/µl, MBI Fermentas) versetzt, mit Aqua dest. auf ein Reaktionsvolumen von 10µl eingestellt und 16h bei 15°C inkubiert. Die Ligationsansätze wurden bis zur Transformation bei 4°C gelagert.

3.2.7.4. Transformation

Aliquots von je 50µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit 0,7µl β-Mercaptoethanol (1,44M) 10min auf Eis inkubiert. 2-10µl des Ligationsansatzes wurden zugegeben und weitere 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für exakt 30s im 42°C-Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250µl auf 42°C vorgewärmten LB-oder SOC-Mediums wurden die Ansätze für 1h im 37°C-Bakterienschüttler (180rpm) inkubiert, anschließend verschiedene Volumina auf LB-Ampicillin-Agarplatten (40µg Ampicillin/ml) ausgestrichen und die Platten für 16-18h bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien wurden in LB-Medium vermehrt, die Plasmid-DNA in analytischem Maßstab präpariert (3.2.5.2) und durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen oder durch PCR mit insertspezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts überprüft.

3.2.7.5. Subklonierung mit Hilfe des TOPO-Kits

Sämtliche Subklonierungen von PCR-Produkten wurden mit dem pCR-2.1 Vektor des TOPO-Kits (Invitrogen) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Der Kit enthielt alle benötigten Enzyme, Puffer sowie kompetente Bakterien.

Die PCR-Produkte wurden mit der *Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) generiert. Da viele *Taq*-DNA-Polymerasen eine ausgeprägte Deoxynukleotidtransferase (TdT)-Aktivität zeigen, weisen die PCR-Produkte A- bzw. T-Überhänge auf. Diese Besonderheit wird vom pCR2.1 des TOPO-Kits dahingehend ausgenutzt, dass dieser Vektor prälinearisiert mit einem Thymidinüberhang an beiden Enden vorliegt und an seinen beiden Enden kovalent gebundene Topoisomerase besitzt. Die durch die Ablösung der Topoisomerase freiwerdende Energie wird zum Ligieren des PCR-Produktes genutzt. Folgender Klonierungsansatz wurde gewählt:

1-5µl	gereinigtes PCR-Produkte
1µl	Vektor
1µl	Salzlösung

Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend transformiert. Die Transformation von 2µl Ligationsansatz erfolgte mit 50µl superkompetenter TOP 10F⁻-Bakterien (Effizienz > 1x10⁹cfu/µg) wie unter 3.2.7.4. beschrieben.

Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf LB-Ampicillin-Agarplatten (40µg Ampicillin/ml) ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht wurden gewachsene Einzelkolonien gepickt und in LB-Medium vermehrt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab präpariert (3.2.5.2.).

Durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen oder PCR mit insertspezifischen Primern und anschließender Gelelektrophorese wurde auf das Vorhandensein der gewünschten Inserts geprüft. Die Inserts wurden in beide Richtungen vollständig sequenziert und auf Mutationen überprüft.

3.2.7.6. Umklonieren in den viralen Expressionsvektor SFG

Die PCR-Produkte wurden nach der Zwischenklonierung in den pCR2.1-Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Der linearisierte, dephosphorylierte Vektor und das jeweilige gereinigte, modifizierte PCR-Produkt wurden in einem molaren Verhältnis von 1:10 in eine Ligation (s. 3.2.7.3.) eingesetzt und in TOP 10F['] oder XL-Blue Bakterien

transformiert (s. 3.2.7.4.). Plasmid-DNA aus Einzelkolonien wurde zuerst im analytischen Maßstab präpariert, auf das Vorhandensein eines Inserts der erwarteten Größe getestet und dann in präparativem Maßstab isoliert. Das Insert wurde in beiden Richtungen vollständig sequenziert und in die nachfolgende Transfektion (3.2.9) eingesetzt.

3.2.7.8. Kovalentes Binden von MBP₇₁₋₉₀ an die β -Kette von RT1B¹

Hierzu wurde über ein 10aa großes Peptidverbindungsstück das MBP₇₁₋₉₀ Peptid kovalent mit dem N-Terminus der β -Kette verbunden, wobei der C-Terminus des MBP₇₁₋₉₀ Peptids via eine singuläre NheI-Schnittstelle (GCT AGC), welche sich am Übergang zwischen Peptid und Verbindungsstück befand, an den N-Terminus des Verbindungsstücks angefügt. Dies erfolgte über PCR (3.2.6.1.) mit den in 2.8.1 beschriebenen Primern.

3.2.7.9. Generierung des RT1B¹ $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts

Die Generierung des $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukt erfolgte in mehreren Schritten. Dazu wurden chimäre Primer, welche unter 2.8.1 beschrieben sind, in einer PCR eingesetzt. Schritt eins generierte dabei die cDNA der $\beta 1$ und $\alpha 1$ Domänen über 28 Zyklen mit den folgenden Parametern: Denaturation für 20s bei 95⁰C, Anlagerung für 1.5min bei 55⁰C und Extension für 1.5min bei 72⁰C. Danach wurden die so amplifizierten Produkte über ein Agarosegel isoliert und gereinigt. In Schritt zwei wurden die so gereinigten β und α PCR Produkte im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt (jeweils ca. 500ng) und ohne zusätzliche Primer für 5min bei 95⁰C denaturiert. Darauf folgen zwei Zyklen Denaturation für 1min bei 95⁰C, Annealing für 2min bei 60⁰C und Extension für 5min bei 72⁰C. In diesem Schritt erfolgte über die anfänglich eingesetzten chimären Primer eine Überkreuzverbindung der vier unterschiedlichen singulären DNA Stränge und in dessen Folge eine Elongation der chimären, doppelsträngigen DNA über die DNA-Polymerase. In Schritt drei wurden die so elongierten PCR Produkte in 26 Zyklen für 5min denaturiert bei 95⁰C, ein Anlagerung erfolgte in

Gegenwart der in der ersten PCR eingesetzten α und β Primer für 1min bei 60°C mit einer anschließenden Extension für 1min bei 72°C.

Das fertige PCR Produkt des $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts wurde danach über ein Agarosegel gereinigt und isoliert. Die Überprüfung des Konstrukts erfolgte über Sequenzanalyse (siehe auch Burrows et al. 1997).

3.2.7.10. Generierung von RT1B¹ „Singlechain-Molekülen“

Im Subklonierungsvektor pCR2.1 wurde der C-Terminus des extrazellulären Bereichs der RT1B¹ β -Kette (Sc-Molekül II) bzw. nur die $\beta 1$ -Domäne (Sc-Molekül I) über ein 24aa Peptidverbindungsstück über eine singuläre BspE1 Schnittstelle an den N-Terminus der reifen RT1B¹ α -Kette angefügt. Um das Singlechain Konstrukt zu vervollständigen, wurde hier ebenfalls das MBP₇₁₋₉₀-Peptid über ein 11aa Peptidverbindungsstück kovalent an den N-Terminus der RT1B¹ β -Kette angefügt (siehe 3.2.7.8.). Dies erfolgte über PCR (3.2.6.1.) mit den in 2.8.1. beschriebenen Primern.

3.2.8. Sequenzieren von DNA

Zur Sequenzierung von DNA mittels der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger wurden hier Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynukleotide benutzt, wobei das Didesoxynukleotid an seinem 3'-Ende jedes durch die DNA-Polymerase entstandenen Fragmentes anhand seiner Farbe identifizierbar ist. Die Sequenzierungs-PCR ist eine lineare PCR, da nur ein Primer in jedem Reaktionsansatz verwendet wird. Nach der Sequenzierreaktion wird die DNA gefällt und zur Analyse im Sequenziergerät ABI 310 Sequencer (Perkin Elmer) in TSR aufgenommen. Die Sequenz wird als 4-Farbdiagramm ausgegeben, wobei jeder Base eine Farbe zugeordnet ist. Unter Optimalbedingungen können ca. 500 Basen pro Reaktion gelesen werden.

Der Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

x μ l	DNA in H ₂ O (z.B. 500ng DNA bei ca. 3kb Plasmid-DNA)
25ng	Primer
2,5 μ l	<i>Taq</i> -Seq-Mix

Auf 10 μ l mit Aqua dest. auffüllen. Die Reaktion erfolgte in 30 Zyklen mit 10s 96°C, 5s 50°C und 4min 60°C im Sequenzier-PCR-Gerät. Nach der Amplifikation wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 90 μ l H₂O und 10 μ l 3M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Durch Zugabe von 250 μ l 90%igen Ethanol (bei RT) wurde die DNA gefällt und 20min bei 13000rpm sedimentiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10-15 μ l TSR-Puffer (hauseigene Herstellung) aufgenommen. Die Probe wurde vor der Analyse im Sequenziergerät 2min bei 94°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in ein spezielles Sequenzanalyse-Reaktionsgefäß überführt.

3.2.9. Gerichtete Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR

Der gezielte Austausch einzelner Nukleotide wurde durch Oligonukleotide erreicht, deren komplementäre, überlappende 5'- Enden die gewünschte mutierte Sequenz trugen. Stellvertretend sind hier die Oligonukleotide Oli 1 und Oli 2 beschrieben, mit denen die Aminosäure Methionin (ATG) in die Aminosäure Valin (GTG) der RT1B¹ α -Kette mutiert wurde.

5`- CCC ATG CCA TGG CTC TGC AGA CCC CCA GCT TCC TCC TC- 3`

5`- GAG GAG GAA GCT GGG GGT CTG CAG AGC CAT GGC ATG GG-3`

Die PCR wurde mit dem Quick-Change-Mutagenesis-Kit (Stratagene) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt:

Die PCR-Reaktionen wurden in speziellen, dünnwandigen 0,5ml Mikro-reaktionsgefäßen in einem Perkin-Elmer Thermocycler 480 durchgeführt.

Für die Amplifikationen wurden 0,125U *Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas) in einem 25µl Reaktionsansatz eingesetzt.

Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1pg-1ng	dsDNA
1µl	Nukleosidtriphosphatmix (je 2,5mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
50ng	Oligonukleotide
2,5µl	10x Reaktionspuffer (MBI Fermentas)
0,5µl	50mM MgCl ₂
0,125µl	<i>Platinum-PFX</i> -Polymerase (1U/µl, Invitrogen)

Das Volumen wurde mit Aqua dest. auf 25µl eingestellt, mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet und bis zur Überführung in den auf 94°C vorgeheizten Thermocycler auf Eis gestellt.

Die Amplifikation bestand aus folgenden Schritten: Nach einmaliger, vollständiger Denaturierung der DNA (94°C, 4min) folgten 12 Zyklen mit Denaturierung (30s, 94°C), Hybridisierung (1min, Hybridisierungstemperatur) und Verlängerung (2min pro Kb Plasmidlänge, 68°C). Nach abschließender Inkubation für 10min bei 72°C wurden 5µl jedes PCR-Ansatzes zusammen mit geeigneten Markern auf ein Agarosegel aufgetragen und die Größe der amplifizierten PCR-Produkte bestimmt.

Anschließend wurde 1ul des Enzyms Dpn-1 direkt in das PCR-Gefäß pipettiert. Dpn-1 erkennt nur methylierte DNA und verdaut somit das nichtmutierte Template Plasmid, das anderenfalls zu Konaminationen in der anschliessenden Transformation führen kann.

3.2.10. Transduktion von Genen in eukaryotische Zellen durch virale Vektoren (Transfektion)

Die Methode ist in Fig. 1 schematisch dargestellt. Transiente Transfektion mit viralen Vektoren wurde von Pear et al., 1993 beschrieben.

Die retrovirale Transfektion ist eine elegante Methode, um in eukaryotischen Zellen Gene zu exprimieren und deren Funktion zu analysieren.

Mittels Kalziumphosphat-Präzipitation werden in die Verpackungszelllinie 293T Plasmide transfiziert, die die für die Virusproduktion notwendigen viralen Elemente *gag* (kodiert für gruppenspezifische Antigene), *pol* (Polymerase) und *env* (Hüllproteine), sowie das sogenannte „gene of interest“, dessen Genprodukt letztendlich zur Expression gebracht werden soll, enthalten. Von der Verpackungszelllinie wird ein nicht selbständig vermehrungsfähiges Virus ins Medium freigesetzt und die Zielzelle mit diesem virushaltigen Überstand infiziert. Das „gene of interest“ wird nun in das Zielzell-Genom eingebaut. Dort erfolgt anschließend die Expression der viralen genetischen Information. Handelt es sich dabei um ein Gen, das für ein Oberflächenmolekül kodiert, so kann eine erfolgreiche Expression auf der Zelloberfläche z.B. mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Vektor	enthaltene Gene
SFG-S65T	<i>gfp</i> (green fluorescence protein)
pHIT60	<i>gag, pol</i> von MoMLV
pVSV-G	<i>env</i> von HVSV

Während es sich bei *gag* und *pol* um retrovirale Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)-Gene handelt, wurde das *env* des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) verwendet, welches über sein G-Glycoprotein mit einer Phospholipid-Komponente der Zielzellplasmamembran interagieren und so eine große Bandbreite an Zielzellen infizieren kann. Das gebildete infektiöse Virus ist folglich ein Pseudotyp, bestehend aus einem retroviralen Genom in einem VSV-Kapsid.

Im folgenden ist eine Transfektion mit „green fluorescence protein“ GFP, enthalten im viralen Vektor, beschrieben.

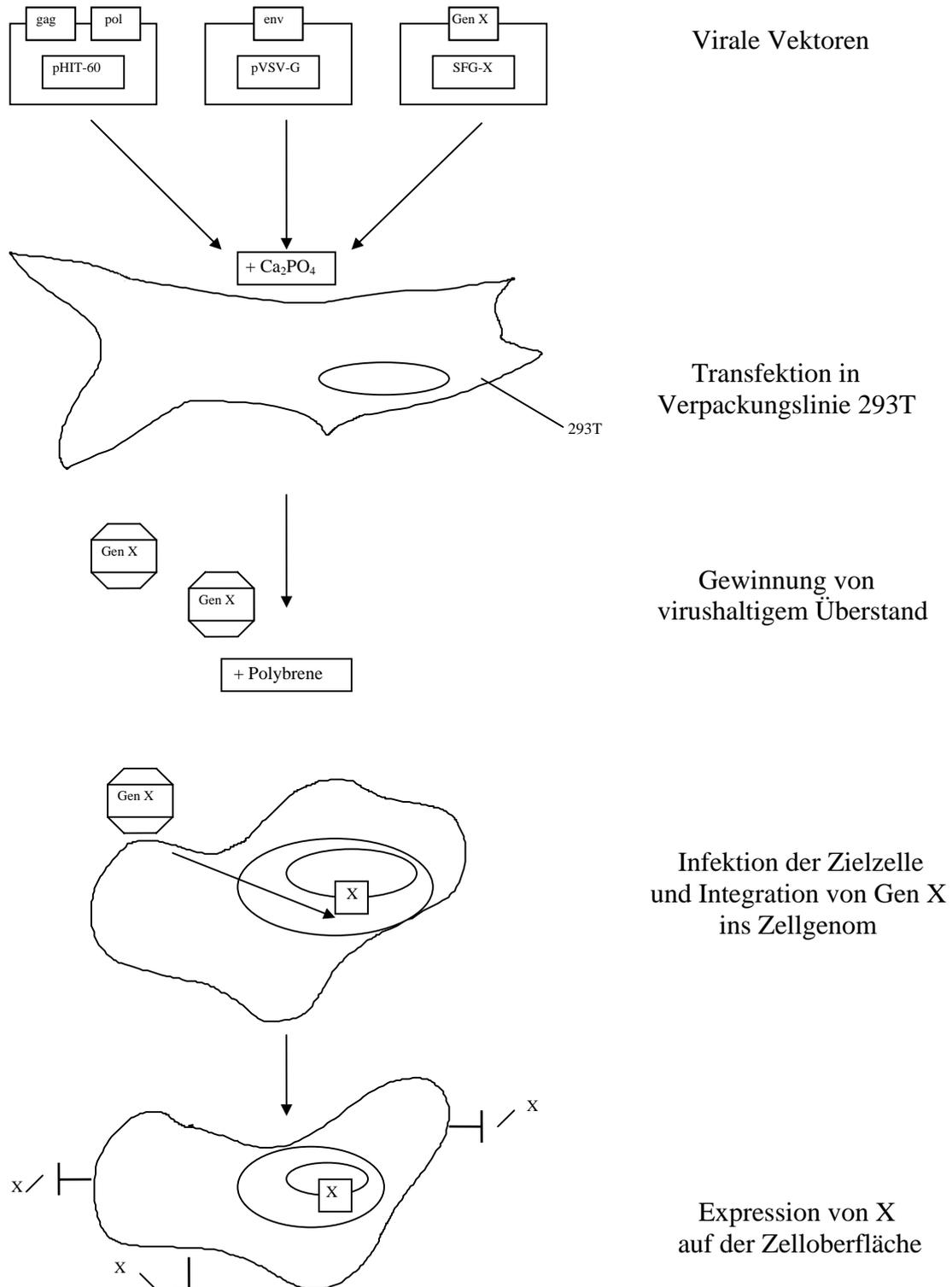


Fig. I : Schematische Darstellung der Expression von Rezeptorgenen in eukaryotischen Zellen mittels viraler Vektoren

Die Verpackungslinie 293T wird durch Kalziumphosphat mit viralen Plasmiden transfiziert. Diese Plasmide enthalten *gag* und *pol* des Moloney Mouse Leukemia Virus MoMLCV (*pHIT-60*), *env* des Vesicular Stomatitis Virus (*pVSV-G*) und das zu transduzierende Gen X (*SFG-X*), welches in diesem Fall für ein Zelloberflächenmolekül kodiert. Die transfizierten 293T-Zellen setzen nicht-vermehrungsfähige Viren ins Kulturmedium frei, die die Information des Rezeptorgenes X enthalten. Eukaryotische Zielzellen werden mit dem virushaltigen Überstand infiziert. Das Virion integriert in das Genom der infizierten Zelle, das Genprodukt von X wird exprimiert und kann auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Folgende Vektoren wurden eingesetzt:

Je 5µg der notwendigen Plasmide (pHIT60, pVSV-G, SFG-S65T) wurden mit Ethanol präzipitiert, durch Waschen mit 70%igen Ethanol sterilisiert und in 438µl sterilem Aqua dest. aufgenommen und bis zur Transfektion bei -20°C gelagert.

Tag 1:

2×10^6 293T-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6cm Durchmesser in 5ml DMEM⁺ bis zu einem Konfluenzgrad von ca. 90% kultiviert.

Tag 3:

Vor der Transfektion wurde das HEPES-haltige DMEM⁺ durch 4ml HEPES-freies DMEM ersetzt, da im Medium enthaltenes HEPES den für die Präzipitatbildung kritischen pH beeinflussen würde.

Zu den vorbereiteten 438µl Plasmidansätzen wurden 62µl CaCl₂ gegeben und gut gemischt. Sofort nach der Zugabe von 500µl 2xHBS wurde das Präzipitat mit der Pipette spiralförmig auf die 293T-Zellen getropft und durch leichtes Schwenken mit dem Kulturmedium vermischt. Die behandelten Ansätze wurden für 7-10h im Inkubator (37°C, 5% CO₂) weiter kultiviert.

Anschließend wurde das Medium durch 5ml DMEM⁺ ersetzt und die Zellen für weitere 12h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Tag 4:

Das Medium wurde erneut vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 3ml DMEM⁺/10mM Natriumbutyrat (Stock: 500mM in Ca- und Mg-freiem PBS) für weitere 8-12h kultiviert. Natriumbutyrat aktiviert den CMV-Promotor der viralen Plasmide, wodurch es zu einer verstärkten Expression der Gene (ca. 10-fach) und somit zu einer Erhöhung des Virustiters kommt. Das natriumbuty Rathaltige Medium wurde anschließend abgenommen, die Zellen vorsichtig mit 3ml DMEM⁺ gewaschen, mit weiteren 3ml DMEM⁺ bedeckt und für weitere 8-12h kultiviert.

Tag 5:

Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen, durch 0,45µm Spritzenaufsatzfilter filtriert und mit 8µg Polybrene/ml (Stock: 800µg Polybrene in Ca- und Mg-freiem PBS) versetzt. Bei Kotransfektion von γ - bzw. δ -TCR wurden die das entsprechende Virus enthaltende Überstände bereits vor Infektion der Zielzellen gemischt. 2×10^5 Suspensionszellen (BW58) wurden mit 1,5ml bis 3ml des virushaltigen Überstandes in 24- bzw. 12-Napf-Zellkulturplatten für 4h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 15ml-Zentrifugenröhrchen transferiert, mit BSS gewaschen (5min, 1600rpm), das Zellpellet in 3ml RPMI⁺ resuspendiert, die Zellen wieder in Zellkulturplatten überführt und dann weiter kultiviert.

Tag 7:

Frühestens 2 Tage nach Infektion wurden die Zielzellen durch Immunfluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer getestet.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Rekombinante Proteinexpression in Prokaryoten

Die Expression eukaryotischer Gene in Prokaryoten ist seit langem ein etabliertes System zur Analyse der Genfunktion und Anreicherung von Proteinen. Hierbei erfolgt die Induktion und die Expression der Gene unter definierten Bedingungen und es sind in der Regel hohe Proteinausbeuten zu erwarten. Weiterhin sind die problemlose Kultur und Wachstumskontrolle der Bakterien (meist *E. coli*) von Vorteil.

3.3.1.1. Proteinexpression über den T7-Promotor und das pET-Vektorsystem

Das pET-System ist ein Klonierungs- und Expressionssystem für rekombinante Proteine in *E. coli*. Die Zielgene werden unter der Kontrolle der Bakteriophagen T7 Transkriptions- und Translationssignale in die pET Plasmide kloniert. Die Expression wird über Zufügungstellung einer T7-RNA Polymerase Quelle in der Wirtszelle induziert. Die T7-RNA Polymerase ist dabei unter der Kontrolle des *lac*-Operons, wobei die Expression durch Zugabe von IPTG induziert wird.

3.3.2. Proteininduktion durch IPTG

Nachdem das getragene Plasmid in den BL21DE3 lysogenen Bakterien erfolgreich etabliert wurde, wird die Expression der Ziel-DNA durch Zugabe von 0.4 mM IPTG zur Bakterienkultur induziert. Hierbei wurden 1l Bakterienkultur bis zu einer optischen Dichte von 0.6 bei 37°C bei 180 rpm geschüttelt und eine Probe als uninduzierte Kontrolle entnommen. IPTG wurde von einem 100mM Stock zu einer finalen Konzentration von 4mM zugegeben und für weitere 3h geschüttelt. Anschliessend wurden die Bakterien bei 5000xg für 10min. bei 4°C abzentrifugiert (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.3. Reinigung von „Inclusion Bodies“

Die Reinigung erfolgte ca. 3h nach der IPTG Induktion. Die Bakterien wurden in eiskaltem PBS gelöst und anschliessend bei 60% Leistung des Sonifizierers für 3x20s sonifiziert. Die Mischung wurde daraufhin 3x in eiskaltem PBS gewaschen (5000xg) und das Pellet dann in 6M Harnstoff / 20mM Ethanolamin für 4h gelöst. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 30 min. bei 45.000 rpm in einem Sorvall SW55C-Rotor. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und bis zur Chromatographie bei 4 °C aufbewahrt (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.4. Ionen-Austausch-Chromatographie mittels FPLC

Die Anionen-Austauschchromatografie wurde bei 4 °C unter Verwendung einer XK 26/16 Säule, beladen mit dem Anionen-Austausch Medium Source 30 (30ml), durchgeführt. Die zu trennenden Proteinkomponenten wurden auf die mit 6M Harnstoff und 20mM Ethanolamin äquilibrierte Säule aufgetragen und mittels einem 1M NaCl Hochsalzpuffer unter Verwendung eines programmierten Gradienten eluiert. Die Detektion der eluierten Fraktionen erfolgte durch die Messung der Absorbtion bei 280 nm. Aliquots ausgewählter Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und dialysiert (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.5. Dialyse

Die Dialyse wurde für einen Pufferaustausch verwendet. Die dazu verwendeten Dialyseschläuche bestehen aus semipermeablen Membranen aus regenerierter Cellulose, wobei der molekulare „cutoff“ unter dem des zu reinigenden Proteins lag. Die Schläuche wurden in destilliertem Wasser gewaschen und vorbereitet. Anschliessend wurde die Proteinmischung (ca.10ml), die in 6M Harnstoff/20mM Ethanolamin-Puffer vorlag in den Dialyseschlauch gefüllt und dieser mit entsprechenden Klammern verschlossen. Die Dialyse erfolgte zuerst gegen Wasser/20mM Ethanolamin, um schrittweise den Harnstoff zu entfernen

(2x 5l für 24h) und dann gegen PBS mit pH 10, indem der Dialyseschlauch in ein Gefäß mit selbigem Puffer (5l) gelegt und 24h kontinuierlich gerührt wurde (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.6. Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde bei 4 °C durchgeführt. Dabei wurde eine zuvor mit PBS pH10 äquilibrierte HR 16/60 Säule (beladen mit Superdex 75) mit der Proteinprobe beladen. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280nm. Die erhaltene Proteinfraktion wurde gelelektrophoretisch analysiert (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.7. Konzentrierung von Proteinen

Das Konzentrieren von Proteinlösungen wurde mit Centricon YM-10 Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (10.000 MW cut-off) nach den Beschreibungen des Herstellers durchgeführt. Die Aufkonzentration erfolgte bei 5000x g bei 4 °C in einem SS-34 Sorvall Rotor bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war (Burrows et al., JI, 1998, 161: 5987-5996).

3.3.8. Proteinbestimmung von Proteinen nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung besteht darin, dass in saurer Lösung befindliches Coomassie Brilliant-Blau G-250 an Proteine bindet, und in seiner gebundenen Form eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465\text{nm}$ (ungebunden) nach $\lambda = 595\text{nm}$ bewirkt. Verwendet wurde eine Fertiglösung (Bio-Rad), die vor Gebrauch 1:5 mit H₂O verdünnt wurde. Die Erstellung der Eichgeraden wurde mittels einer 1mg/ml konzentrierten BSA Lösung durchgeführt. Zu 1ml des verdünnten Bradford-Reagenz wurden jeweils 2,4,6 und 8µl der BSA-Lösung gegeben und die OD bei $\lambda = 595\text{nm}$ gemessen. Die BSA-

Konzentration wurde gegen die gemessene OD aufgetragen. Aus den Messwerten wurde mittels Computerprogramm eine Regressionsgerade erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Proteine in den Eluatfraktionen bestimmt wurde.

3.3.9. ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) stellt ein Testsystem dar, mit dessen Hilfe entweder Antikörper oder das entsprechende Antigen quantitativ bestimmt werden können. Dabei dient eine Enzym-Substratumsetzung als Indikatorreaktion. Man unterscheidet zwischen direktem und indirektem ELISA (sandwich-Methode).

Zum Screening von Hybridomüberständen wurde der indirekte ELISA durchgeführt mit Hilfe des Pharmingen Kits OPT-EiA:

Hiebei wurde der Boden der ELISA-Platten mit 100µl/well einer Antikörper-Lösung in coating-buffer bedeckt und die Platten übernacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3x mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 200µl/well Blockierungslösung für 1h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Platten erneut 3x gewaschen und je 100µl/well der zu testenden Hybridomüberstände und des Standards zugegeben und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen wurde ein Detektor-Reagenz (Sekundär-Antikörper + Avidin-HRP Reagenz) zugegeben und die Platten für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde erneut 3x gewaschen und anschliessend das Entwicklungssubstrat zugegeben. Nach etwa 45min bei Raumtemperatur wurden 50µl/well Stop Lösung zugegeben und die Platten optisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei der Wellenlänge 580nm ausgewertet.

3.3.10. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Proteine können identifiziert und charakterisiert werden, indem man sie in einem Polyacrylamid-Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auftrennt. Die SDS-PAGE ist eine denaturierende Gel-Elektrophorese. Das ionische Detergenz SDS lagert sich an die Proteine an und verleiht ihnen damit vergleichbare Ladungsdichten, so dass die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld lediglich von der Molekülgrösse, nicht aber von der Eigenladung der Proteine abhängt (Laemmli). Zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen wurden i.d.R Gele mit einem Acrylamidgehalt von 12% verwendet.

Die Proben wurden vor dem Auftragen in Laemmli Puffer, dem 5% 2-Mercaptoethanol zugesetzt worden war, aufgenommen und 5 min gekocht. Der Einlauf in die Taschen des Sammelgels erfolgte bei 45mA, der Lauf im Trenngel bei 35mA.

Bei der sogenannten nativen PAGE, bei der Proteine im nativen Zustand (nicht denaturiert) aufgetrennt wurden, blieb der SDS-Gehalt in jedem Puffer bei 0,1% und die Proben wurden nicht aufgeköcht

3.3.11. Biotinylierung von Peptiden

Die zu biotinylierenden Peptide wurden mittels NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford) biotinyliert. Das Biotin wurde in doppelt destilliertem Wasser gelöst (1mg/100µl) und im zweifachen molaren Überschuss zu den in 0,5M NaHCO₃, pH 9 gelösten Peptiden zugegeben. Nach 2h Inkubation auf Eis wurde 2M Tris-HCL Puffer, pH 6,3 als 10% des Gesamtvolumens zugegeben, um eine unerwünschte Restaktivität von noch freiem Biotin zu verhindern (Joosten et al., 1994).

3.3.12. MHC Klasse II- Peptid-Bindungs-Assay

Über FPLC gereinigte MHC Klasse II Moleküle (2-3 μ M) wurden mit 5-500nM biotinyliertem Peptid bei pH 5 in einem Gesamtvolumen von 15 μ l für 48 Stunden bei Raumtemperatur in Gegenwart eines Protease Inhibitor Cocktails (Endkonzentration: 1mM Phenylmethylsulphonylfluorid, 135 μ M Naptosyl-L-Lysin-chloromethyl Keton, 142 μ M L-p-tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl Keton, 1mM N-ethyl- Maleimid, 8mM EDTA, 1,3mM 1,10-Phenanthrolin und 73 μ M Pepstatin A) und einer Detergenzkonzentration von 0,05% NP-40.

Die MHC-Peptid Mischungen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (nativ) analysiert (Joosten et al., Int.Immunology, 1994: 751-759).

3.3.13. Western-Blot Analysen, Chemoluminiszenznachweis

Über SDS-PAGE separierte Proteine wurden aus ihrem Polyacrylamidgel durch Elektrotransfer in einer speziellen Blotkammer (Biorad) auf einer Nitrocellulose-membran (Hybond-ECL, Amersham) durch Übernachtinkubation immobilisiert.

Ein erfolgreicher Transfer der Proteine wurde mittels Ponceau S nachgewiesen.

Der Farbstoff wurde durch intensives Waschen (H₂O, TBS/Tween20) herausgelöst und die Membran anschliessend mit einer TBS/Tween20-5% Trockenmilch Lösung für 1h geblockt um unerwünschte Bindungen zu verhindern. Nach weiterem Waschen wurde der Blot für 1h mit einer Streptavidin gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (1:10000, Sigma) behandelt. Um überschüssige Konjugatkomplexe zu entfernen wurde erneut für 3x10 min gewaschen. Anschliessend erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem ECL-Kit (Amersham) auf speziellem Fotopapier (Fuji) (Joosten et al., Int.Immunology, 1994: 751-759).

3.3.14. Antikörper vermittelter Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Der selektiver Nachweis Proteine nach dem Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte über den spezifisch bindenden monoklonalen Antikörper OX-6. Der Antikörper wurde hierbei in einer Verdünnung von 1:5000 der gewaschenen Membran zugegeben. Anschließend wurde die Membran für 3x10 min gewaschen und der Peroxidase gekoppelte Sekundäantikörper zugegeben ($G\alpha$ MIg, 1:10.000) zugegeben. Überschüssige Konjugatkomplexe wurden auch hier durch intensives Waschen (3x10 min.) entfernt. Die Entwicklung erfolgte auch hier mit dem ECL-Kit.

3.3.15. Herstellung von Zellysaten

2×10^6 Zellen werden für 1min bei 6.000 U/min zentrifugiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Zum Pellet werden 10 μ l WCE-Puffer (Aprotinin und Pefabloc) zugegeben. Nach Mischen wird das Gemisch für 15min auf Eis inkubiert und danach erneut gemischt. Es folgt eine Zentrifugation für 20min bei 13.000 U/min. Der dadurch erhaltene Überstand wird in ein neues Cap überführt, mit dem gleichen Volumen Lämmli-puffer gemischt und bei 95⁰C für 5min gekocht. Anschließend werden die Proben geladen und ein Westernblot, wie unter 3.3.13 und 3.3.14 beschrieben, durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion des Ratten MHC Klasse II Moleküles RT1B¹ und des von ihm präsentierten Autoantigens „basisches Myelinprotein“ (MBP) mit autoreaktiven TCR charakterisiert werden. Hierbei wurde vor allem die Interaktion mit dem TCR 35/1 analysiert, der typisch für TCR ist, die in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) der LEW Ratte vermehrt zu finden sind. Für diesen Zweck wurde versucht, lösliche MHC Klasse II -artige Moleküle herzustellen und ihre Peptid- und TCR-Bindung bestimmt. MHC Klasse II Konstrukte, die mit einem antigenen Peptid kovalent verbunden sind, wurden ebenfalls generiert, in verschiedenen Zellen exprimiert und ihre T zellstimulatorische bzw. immunmodulatorische Kapazität *in vitro* und *in vivo* getestet und mit einer RT1B¹ Mutante verglichen. Um Aufschluß über die für die Erkennung des RT1B¹ restringierten Antigens MBP₆₈₋₈₈ sowie diverser Superantigene wichtigen Bereiche des TCR zu erhalten, wurde der TCR 35/1, sowie TCR mit mutierten CDR der TCR- β -Kette in Ratten CD28 positiven T-Zelllinien exprimiert und in der Aktivierung durch unterschiedliche Liganden verglichen.

Schließlich wurde getestet inwieweit die Expression von CD28 die für die Aktivierung von $\gamma\delta$ TCR transduzierten T-Zelllinien durch $\gamma\delta$ TCR Liganden essentiell ist. Es zeigte sich, daß erst nach Expression des Korezeptors CD28 eine Aktivierung über TCR Liganden möglich ist. Diese Befunde unterstreichen nicht nur die Bedeutung von kostimulatorischen Rezeptoren für die T Zellaktivierung sondern weisen auch Wege für die Generierung von Zelllinien auf, die als Testsystem für den Nachweis von Liganden des $\gamma\delta$ TCR dienen können.

4.1. Expression von funktionellem RT1B¹ über ein retrovirales Vektorsystem

Als Quelle zur Isolation der zellulären gesamten RNA dienten Lipopolysaccharid aktivierte B-Zellen aus LEW Ratten (Charles River, Deutschland). Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Kit von Quiagen (3.2.4.) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließende RT-PCR wurde wie in 3.2.6.2 durchgeführt. Bei der folgenden PCR wurden Primer eingesetzt, die die C und N-Termini der kodierenden Sequenzen der RT1B¹ α -Kette und der β -Kette abdecken: für die α -Kette lag der 5'-Primer auf Position 35-55 und der 3'-Primer war komplementär zur Position 805-786 (X14879; Syha et al., 1989). Für die β -Kette lag der 5'-Primer auf Position 8-27 und der 3'-Primer war komplementär zur Position 799-779 (X56596; Jedelhauser et al., 1991)(Abb. 1). Die PCR Produkte (Abb.2) wurden direkt TA kloniert in pCR 2.1 TOPO und anschließend sequenziert. Dabei wurde die publizierte Sequenz der β -Kette von RT1B¹ bestätigt. Jedoch zeigten sich bei den neu generierten und der publizierten α -Sequenz Unterschiede, auf die später näher eingegangen wird.

Die neu generierten Klone wurden in MHC Klasse II negative Mauszelllinien mit guten antigenpräsentierenden Eigenschaften exprimiert. Die Zelllinie P80 ist ein CD80 positives Derivat der DBA/2 Mausmastozytomlinie P815 (siehe 2.7.). Die Zelllinie M12.4.1.C3 ist eine Variante der BALB/c B-Lymphomlinie M12.4.1 (siehe 2.7.).

Die Gentransduktion wurde wie in 3.2.10 beschrieben mittels eines MoMLV basierenden retroviralen Vektorsystem durchgeführt (Pear et al., 1993). Nach Analyse der im Klonierungsvektor pCR 2.1 vorliegenden α - bzw. β -Kette von RT1B¹ mußten diese in einen geeigneten Expressionsvektor umkloniert werden. Der virale Expressionsvektor SFG-GFP-S65T (siehe 2.9.) enthält zwischen einer NcoI- und einer BamHI-Schnittstelle ein 738bp großes Fragment des „grün fluoreszierenden Proteins“ GFP. Dieses Fragment sollte zum einen durch die α -Kette und zum anderen durch die β -Kette des pCR2.1-Zwischenvektors (siehe Vektorkarten) ersetzt werden. Die α -Kette wurde dabei 5' blunt und 3' über eine BglII Schnittstelle kloniert, die β -Kette 5' über eine NcoI und 3' über eine BamHI Schnittstelle. Die Vektorkarten (siehe Vektorkarten) zeigen zum einen den retroviralen Expressionsvektor SFG-GFP-S65T mit der Klonierungsstelle für die beiden RT1B¹ -Ketten und zum anderen die beiden Hilfsplasmide pHIT-60 und pVSV-G, die für die Generierung der Viren notwendige virale Elemente enthalten. Die so erhaltenen viralen Konstrukte SFG- RT1B¹ / α und SFG-RT1B¹ / β wurden sequenziert und anschließend transduziert.

RT1B ¹ - α 5'	5' GAG GAC ACC GCT TTA CAA CGA 3'
RT1B ¹ - α 3'	5' AGA GTG AGG TTC TCT GTG T 3'
RT1B ¹ - β 5'	5' AAC ACT TGT GTG TTG GTT CA 3'
RT1B ¹ - β 3'	5' AGT GTA TCA CTT GTA GGA G 3'

Abb. 1: Zur Amplifikation mittels PCR verwendete, für RT1B¹ spezifische Primer

Die ermittelte und verwendete RT1B¹ β -Kette war dabei mit der bereits publizierten Sequenz identisch (Syha-Jedelhauser et al., 1991), die ermittelte RT1B¹ α -Kette zeigte jedoch, wie vorher bereits erwähnt, sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Aminosäureebene Unterschiede zur bereits publizierten Sequenz auf (siehe Abbildung 3). Die ermittelten Unterschiede waren eine Gln>Pro (aa85) in der α 1 Domäne, Leu >Trp (aa125), Val>Leu (aa126), Glu>Arg (aa127) und Phe>Ser (aa160) in der α 2 Domäne.

Die ermittelten Unterschiede der RT1B¹ α -Kette wurden dabei über unabhängige Klonierungen, Sequenzierungen und Expressionen in unserem Labor und dem Labor von C.P.M.B. Broeren von der Universität Utrecht bestätigt worden. Eine andere Gruppe berichtete ebenfalls von der Expression eines funktionellen RT1B¹-Moleküls, kommentierte jedoch nur den Unterschied T>C an Position 479, der zu einem Ser (aa160) der α 2 Domäne führt (Buenafe et al., 2001).

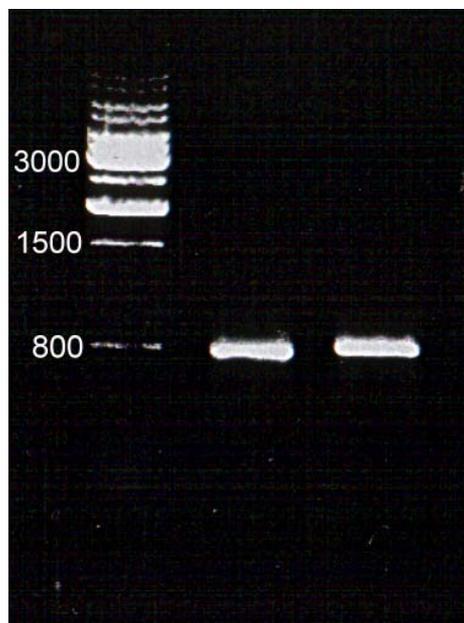


Abb. 2: Isolierte MHC-Ketten von RT1B¹

Mittels RT-PCR wurden die kodierenden Bereiche der α - und β -Kette von RT1B¹ amplifiziert.

Die Fragmentgröße betrug für die so amplifizierten Ketten 771bp (α -Kette: 1.Spur) und 792bp (β -Kette: 2.Spur).

Als Standard diente der 1kb Marker (s. 2.12.).

```

                                     -20                                     -15
                                     atg ccg ctc agc aga gct ctg att ttg ggg
                                     M  P  L  S  R  A  L  I  L  G
                                     1  20  35  40  50  60  70  80  90  100
gtc ctc gcc ctg acc acc atg ctc agc ccc tgt gga ggt caa gac gac att gag gcc
V  L  A  L  T  T  M  L  S  P  C  G  G  Q  D  D  I  E  A
                                     10  15  20  30  35  40  50  60  70  80
gac cac gta gcc gcc tat ggt ata aat atg tat cag tat tat gaa tcc aga ggc cag
D  H  V  A  A  Y  G  I  N  M  Y  Q  Y  Y  E  S  R  G  Q
                                     30  35  40  50  55  60  70  75  80  85  90  100
ttc aca cat gaa ttt gat ggt gac gag gaa ttc tat gtg gac ttg gat aag aag gag
F  T  H  E  F  D  G  D  E  E  F  Y  V  D  L  D  K  K  E
45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95  100
acc atc tgg agg atc ccc gag ttt gga cag ctg aca agc ttt gac ccc caa ggt gga
T  I  W  R  I  P  E  F  G  Q  L  T  S  F  D  P  Q  G  G
65  70  75  80  85  90  95  100  105  110  115  120  125  130  135
ctt caa aat ata gct ata ata aaa cac aat ttg gaa atc ttg atg aag agg tca aat
L  Q  N  I  A  I  I  K  H  N  L  E  I  L  M  K  R  S  N
85  90  95  100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155  160
tca acc cca gct gtc aac aag gtt cct gag gcg acc gtg ttt tcc aag tcc cct gtg
S  T  P  A  V  N  K  V  P  E  A  T  V  F  S  K  S  P  V
105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195
ctg ctg ggt cag ccc aac acc ctc atc tgc ttt gta gac aac atc ttt cct cct gtg
L  L  G  Q  P  N  T  L  I  C  F  V  D  N  I  F  P  P  V
125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215
atc aat atc aca tgg ttg aga aac agc aag cca gtc aca gaa ggc gtt tat gag acc
I  N  I  T  W  L  R  N  S  K  P  V  T  E  G  V  Y  E  T
140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230
agc ttc ctc tcc aac cct gac cat tcc ttc cac aag atg gct tac ctc acc ttc atc
S  F  L  S  N  P  D  H  S  F  H  K  M  A  Y  L  T  F  I
160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250
cct tcc aac gac gac att tat gac tgc aag gtg gag cac tgg ggc ctg gac gag ccg
P  S  N  D  D  I  Y  D  C  K  V  E  H  W  G  L  D  E  P
180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270
gtt cta aaa cac tgg gaa cct gag gtt cca gcc ccc atg tca gag ctg aca gag act
V  L  K  H  W  E  P  E  V  P  A  P  M  S  E  L  T  E  T
200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
gtg gtc tgt gcc ctg ggg ttg tct gtg ggc ctc gtg ggc atc gtg gtg ggc acc atc
V  V  C  A  L  G  L  S  V  G  L  V  G  I  V  V  G  T  I
220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310
ttc atc att caa ggc ctg cga tca gat ggc ccc tcc aga cac cca qqq ccc ctt tga
F  I  I  Q  G  L  R  S  D  G  P  S  R  H  P  G  P  L  ***
220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310

```

Abb. 3: Komplette CDS der RT1B¹ α -Kette

PCR wurde mittels cDNA aus LPS stimulierten LEW Milzzellen mit den in 2.9.1. beschriebenen Primern (hier unterstrichen) durchgeführt. Die gezeigte Sequenz wurde in 6 cDNA Klonen gefunden. Unterschiede zur bisher publizierten Sequenz sind in fett gedruckt dargestellt.

4.1.1 Expression von rekombinantem RT1B¹ auf der Zelloberfläche verschiedener Zelllinien

Der „green fluorescence protein“ GFP enthaltende Vektor SFG-S65T bietet sich an, um die Transduktionsbedingungen zu optimieren und die Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien zu prüfen. Mit den unter 3.2.10. beschriebenen Bedingungen zeigten über 80% der mit SFG-S65T transduzierten Zellen der MHC negativen Zelllinien M12.C3, P80 und BW58C eine Grünfluoreszenz (siehe 2.7.). Etwas niedriger war der Prozentsatz an RT1B¹ positiven Zellen, welche, nach paralleler Transduktion mit SFG- RT1B¹- α und SFG- RT1B¹ - β (Abb.4), über den monoklonalen Antikörper OX-6 nachgewiesen wurden,. Die Expression war über einen Zeitraum von einigen Wochen stabil.

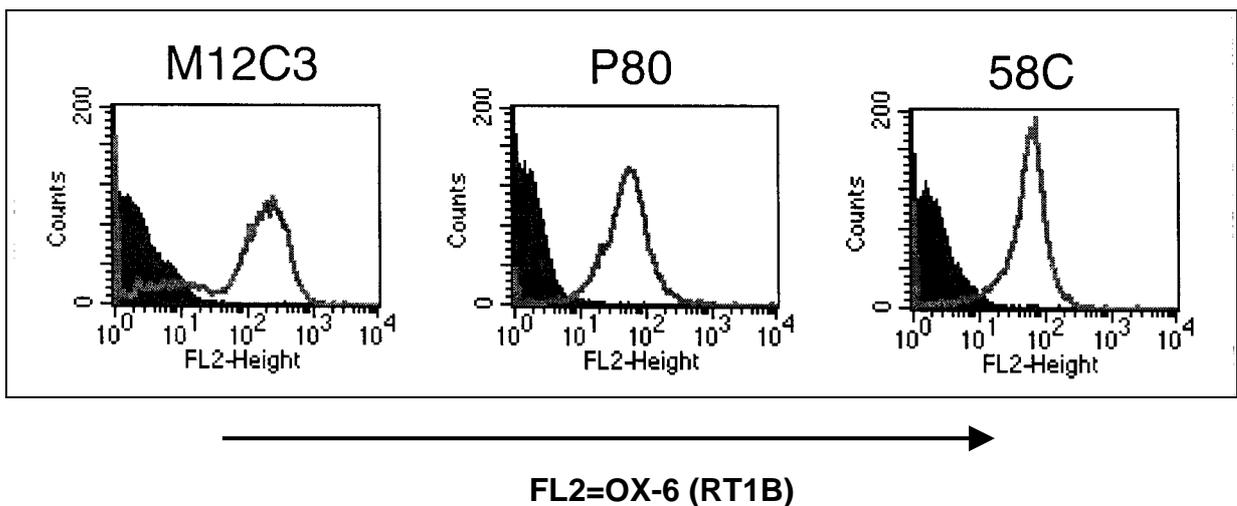


Abb. 4: Oberflächenexpression von RT1B¹ auf den jeweiligen Zelllinien.

Über virale Vektoren wurden die Zelllinien M12C3, P80 und BW58C parallel mit der RT1B¹ α - und β -Kette transduziert.

Die Expression des MHC Moleküls wurde über direkte Immunfluoreszenzanalyse (FACS) mit dem RT1B¹ β spezifischen mAb OX-6-PE nachgewiesen. Gefüllte Histogramme zeigen die OX-6 Bindung vor der Transduktion, die offenen Histogramme zeigen die OX6 Bindung nach Transduktion. Unspezifische Bindungen wurden durch den isotypidentischen Kontrollantikörper V65-PE ausgeschlossen.

4.1.2. Funktionelle Charakterisierung von RT1B¹ als Restriktionselement

Nachdem die Oberflächenexpression des transduzierten RT1B¹ Moleküls über Immunfluoreszenz nachgewiesen war, wurden die mit SFG- RT1B¹- α und SFG- RT1B¹- β transduzierten Zelllinien auf ihre Fähigkeit T-Zellhybridome zu stimulieren getestet. Als Maß für die stimulatorische Kapazität der mit RT1B¹ transduzierten Zelllinien diente die nach der Stimulation erreichte IL-2 Produktion des T-Zellhybridoms 35/1 (siehe 2.7.), welches in den IL-2 Nachweisen verwendet wurde. Das T-Zellhybridom 35/1 ist spezifisch für Ratten- und gpMBP und exprimiert einen für EAE induzierte T-Zellen bei der Lewis-Ratte spezifischen TCR. Bei allen drei getesteten Zelllinien konnte die Fähigkeit das T-Zellhybridom 35/1 zur IL-2 Produktion anzuregen nachgewiesen werden. Abbildung 5 zeigt die Stimulation des Hybridoms 35/1 mit MBP₆₈₋₈₈ als Antigen und transduzierten, sowie den entsprechenden untransduzierten Zelllinien als APC. Die peptidspezifische Induktion der IL-2 Produktion wurde nur mit den RT1B¹ transduzierten Zelllinien ausgelöst und war konzentrationsabhängig. Auf Einzellzebene war die Antigenpräsentation sogar effektiver, als bei den als APC routinemäßig eingesetzten Thymozyten. Sehr ähnliche Ergebnisse wurden mit dem hsp60 spezifischen Ratten T-Zellhybridom A2b (Boots et al., 1991) nach einer Stimulation erzielt, wobei RT1B¹ transduzierte P80 Zellen als APC mit dem entsprechenden kognaten Peptid eingesetzt wurden (Abbildung 6).

Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Zelllinien M12C3, P80 und BW58C, welche mit Ratten Klasse II Genen transduziert wurden, in der Lage sind, spezifischen T-Zellen funktionell und restringiert Antigen zu präsentieren. Dabei genügt die Transduktion des MHC Klasse II Komplexes in die gezeigten Zielzellen alleine, um antigenspezifische Ratten T-Zellen zu aktivieren.

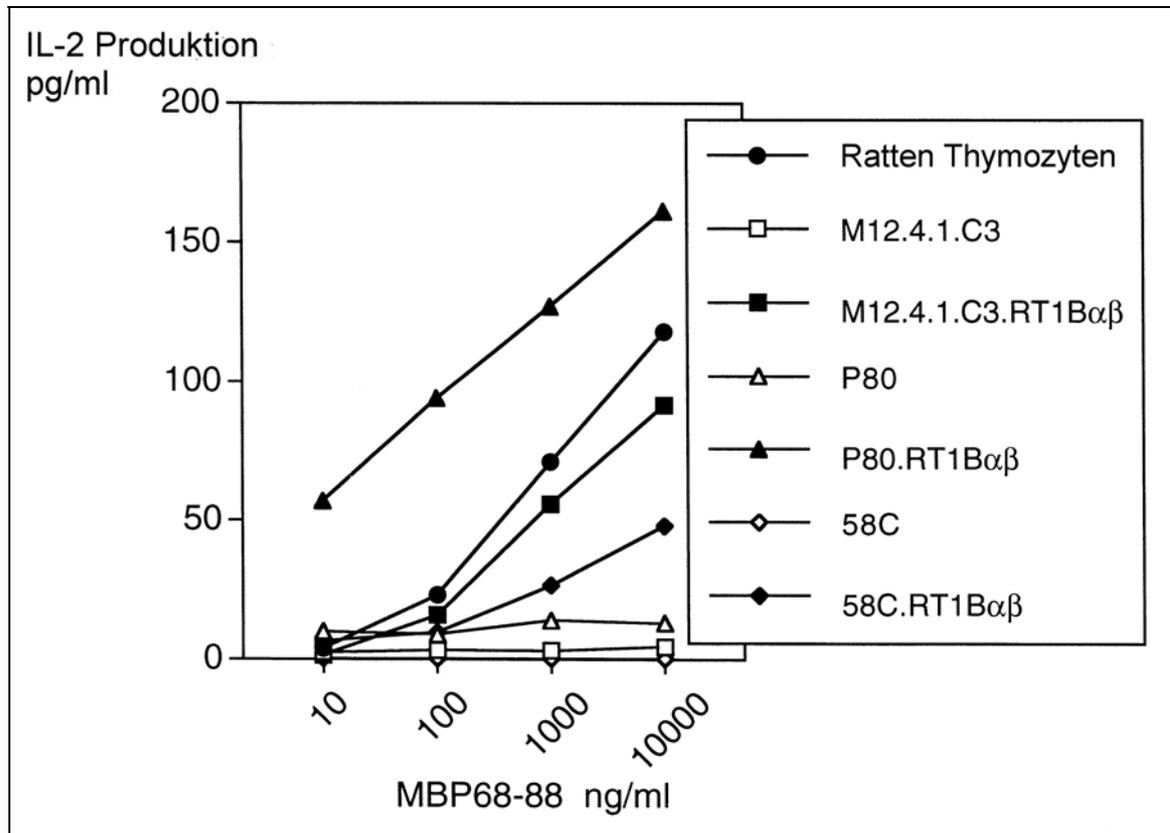


Abb. 5: RT1B¹ transgene Zelllinien präsentieren dem T-Zellhybridom 35/1 das Antigen MBP₆₈₋₈₈

35/1 Zellen wurden für 48h in 96 well Platten mit den gezeigten Konzentrationen an Peptid inkubiert. Als APC wurden 5×10^4 der gezeigten Zelllinien oder 1×10^6 LEW T-Lymphozyten als Kontrolle eingesetzt. Die Stimulationsfähigkeit wurde über die Induktion der IL-2 Sekretion mittels ELISA bestimmt (OptEIA für Maus IL-2).

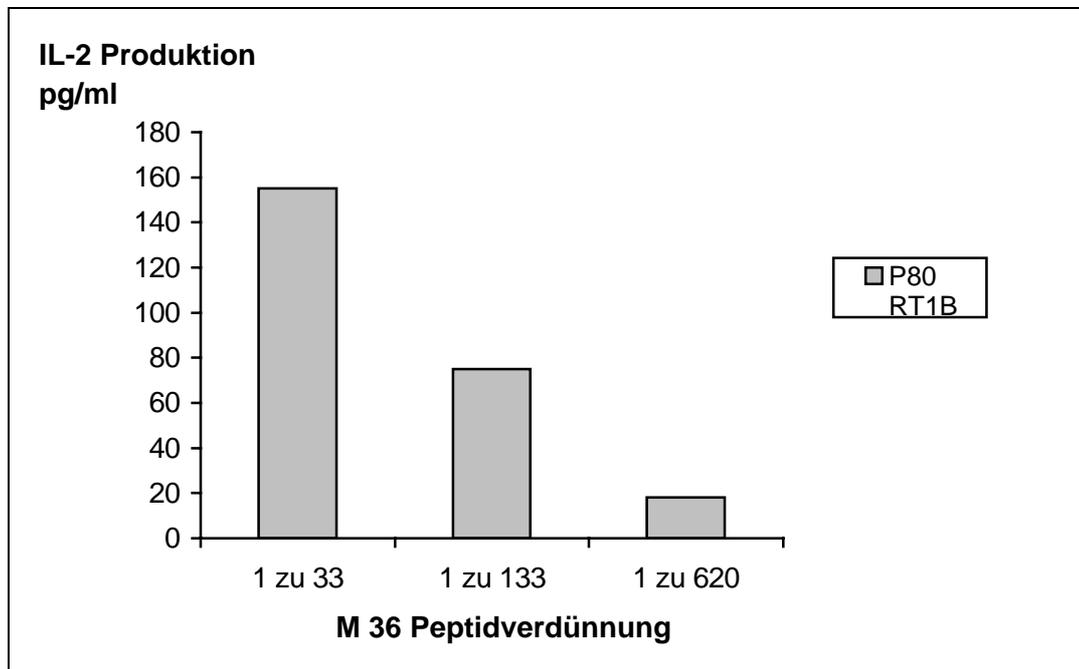


Abb. 6: RT1B¹ transgene P80 Zellen präsentieren dem T-Zellhybridom A2b das Antigen M36

A2b Zellen wurden für 48h in 96 well Platten mit den gezeigten Konzentrationen an Peptid inkubiert. Eine 1:1 Verdünnung entspricht 10µg/ml Als APC wurden 5×10^4 P80RT1B¹ eingesetzt. Die Stimulationsfähigkeit wurde über die Induktion der IL-2 Sekretion mittels ELISA bestimmt (OptEIA für Maus IL-2).

4.2. Untersuchungen einer neuen RT1B¹ α -Ketten Variante (V38M) hinsichtlich Oberflächenexpression und Funktionalität

Bei der Klonierung, Expression und funktionellen Charakterisierung des wildtypischen RT1B¹ ergab es sich, dass auch ein mutiertes RT1B¹ Molekül, für dessen Generierung ein Plasmid mit einem α -Kettengen von Prof. Reske von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt wurde, exprimiert wurde. Diese Molekül enthielt ein α -Kette, die einen Aminosäureaustausch (V=>M) an Position 38 in der α 1 Domäne aufwies.

Interessanterweise zeigte eine Genbank-Sequenzanalyse, dass die Position V38 in über 400 Säugetier MHC Klasse II Molekülen identisch und somit hochkonserviert ist. Ausnahmen hiervon waren grundsätzlich keine Restriktionselemente, wie z.B. DM oder DQ homologe Moleküle. Eine Ausnahme war eine Primatensequenz (V38M).

Abbildung 7 zeigt die Positionierung von V38M im MHC Klasse II Molekül, bzw. der MHC Klasse II Antigenbindungsgrube. Die Molekülstruktur wurde mit Hilfe des Programms „PDB Swiss Viewer“ erstellt und zeigt beispielhaft einen A^d Kristall mit gebundenem OVA₃₂₃₋₃₃₉. Das Antigen ist in Grün dargestellt, Position V38M der RT1B¹ α -Kette in rot. Dabei zeigte sich, dass der im Vergleich zu Valin längere schwefelhaltige Kohlenwasserstoffrest im Methionin sich sterisch ungünstig auf die Antigenbindung auswirken könnte, was zu einem Verlust der Antigenbindung bzw. Präsentation führen könnte.

Anhand von Oberflächenexpression und anschließenden funktionellen Tests sollte diese Hypothese überprüft werden.

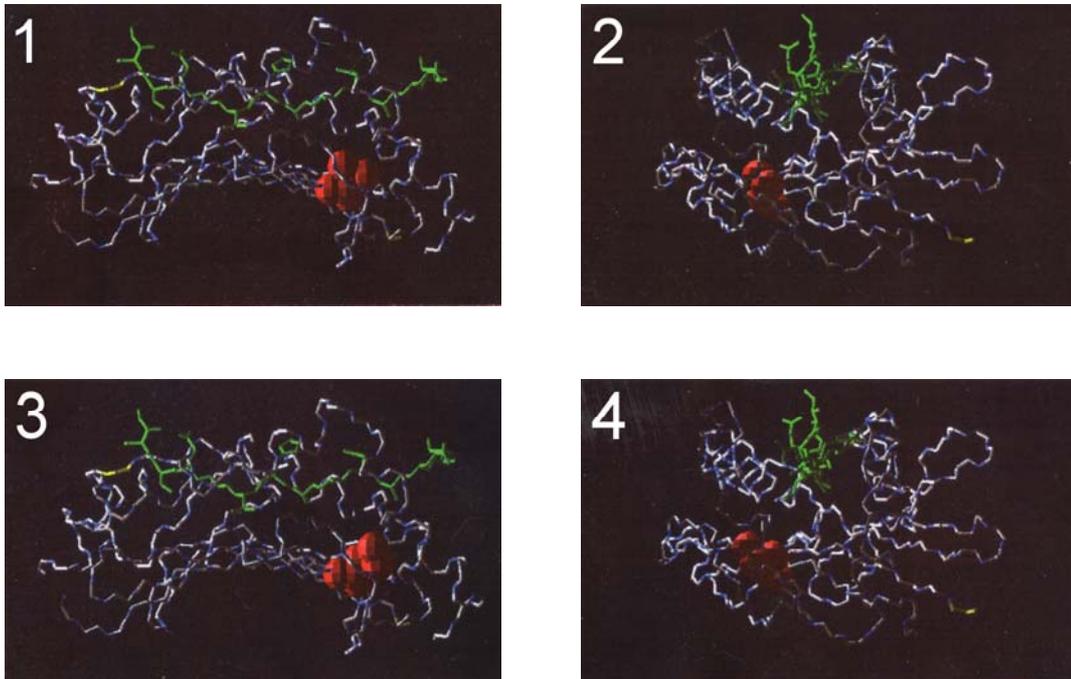


Abb. 7: Positionierung von V38M im MHC Klasse II Molekül

Gezeigt ist die Positionierung von V38M im MHC Klasse II Molekül, bzw. der MHC Klasse Antigengrube. Die Molekülstruktur wurde mit Hilfe des Programms „PDB Swiss Viewer“ erstellt und zeigt beispielhaft einen A^d Kristall mit gebundenem OVA₃₂₃₋₃₃₉. Das Antigen ist in Grün dargestellt, Position V38M der RT1B¹ α -Kette in rot: 1. V38, Seitenansicht; 2. V38, Seitenansicht horizontal 90° gedreht; 3. M38, Seitenansicht; 4. M38, Seitenansicht horizontal 90° gedreht.

4.2.1. Die Mutation V38M der α -Kette von RT1B¹ führt zu einer stark attenuierten Funktionalität

Abbildung 8 zeigt die Expression von nativem RT1B¹ und von RT1B¹ nach Kotretransduktion der nativen β -Kette mit der Variante der α -Kette (V38M) auf der Oberfläche von M12.C3 Zellen. Ca. 80% der Zellen wiesen eine Oberflächenexpression auf. Diese war nur geringfügig durch die Mutation V38M der RT1B¹ α -Kette beeinflusst. Jedoch wurde im Fall der P80 Transduktanten eine teilweise stark reduzierte Oberflächenexpression festgestellt (siehe dazu auch Abbildung 10). In funktionellen Tests konnte interessanterweise gezeigt werden, dass M12.C3 Zellen kotretransduziert mit der nativen β -Kette und der Variante der α -Kette (V38M) trotz guter Oberflächenexpression das MBP Peptid dem T-Zellhybridom 35/1 wesentlich schlechter präsentieren können, dabei sei darauf hingewiesen, dass M12.C3 Zellen eine endogene α -Kette besitzen und dadurch in der Lage sind, durch Einbringung der RT1B¹ β -Kette, MHC Klasse II zu exprimieren, was zu der beobachteten Oberflächenexpression führen könnte.

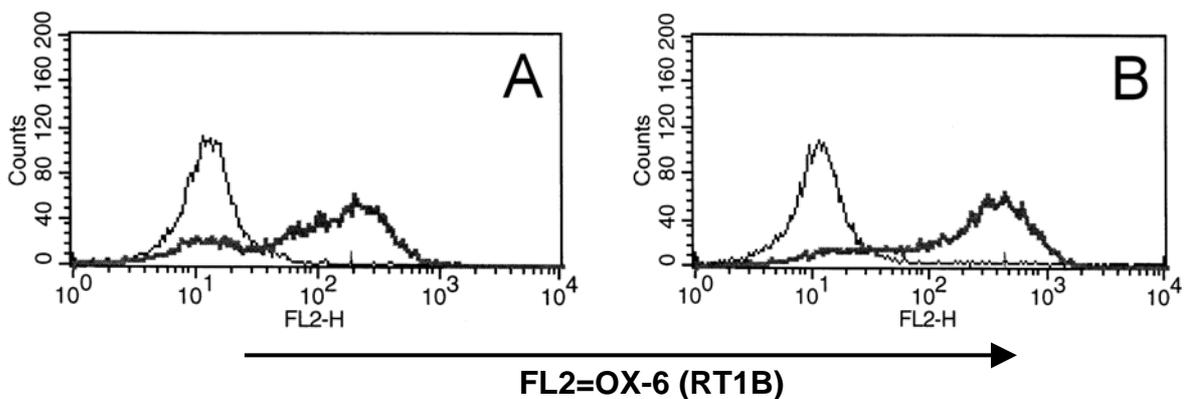


Abb. 8: Oberflächenexpression von RT1B¹ nativ und RT1B¹ α V38M auf M12.C3 Zellen

Über virale Vektoren wurden M12.C3 Zellen parallel mit der nativen RT1B¹ α und β -Kette (B) und ebenfalls parallel mit der Variante RT1B¹ α -Kette V38M- und der nativen β -Kette transduziert (A).

Die Expression des MHC Moleküls wurde über direkte Immunfluoreszenzanalyse (FACS) mit dem RT1B¹ β spezifischen mAb OX-6-PE nachgewiesen. Die Histogramme mit feiner Linie zeigen die OX-6 Bindung vor der Transduktion, die Histogramme mit dicker Linie zeigen die OX6 Bindung nach Transduktion. Unspezifische Bindungen wurden durch den isotypidentischen Kontrollantikörper V65-PE ausgeschlossen.

4.2.2. Durch kovalentes Binden von MBP an die RT1B¹ β -Kette kann die Funktionalität der RT1B α V38M Variante wiederhergestellt werden.

Aufgrund zahlreicher Daten, die zeigen, dass Peptide, welche kovalent an den N-Terminus der β -Kette von MHC Klasse II Molekülen angefügt werden, funktionell mit der Antigenbindungsgrube des MHC Klasse II $\alpha\beta$ -Heterodimer assoziieren (Kozono et al., 1994 und Ignatowicz et al., 1995), wurde dies ebenfalls für das hier verwendete RT1B¹ Molekül durchgeführt, um zu testen, ob der Einfluss der Mutation V38M der RT1B¹ α -Kette auf die Antigenbindung bzw. Funktionalität von MBP durch eine künstliche kovalente Verstärkung der Peptidbindung in der Antigengrube, aufzuheben sei. Hierzu wurde über ein 10aa großes Peptidverbindungsstück im Gegensatz zum löslichen MBP₆₈₋₈₈ Peptid das MBP₇₁₋₉₀ Peptid, welches z.B. von Burrows et al., 1999 in ähnlichen experimentellen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt wurde, kovalent mit dem N-Terminus der β -Kette verbunden, wobei der C-Terminus des MBP₇₁₋₉₀ Peptids mittels eine singuläre NheI-Schnittstelle an den N-Terminus des Verbindungsstücks angefügt wurde. Dies erfolgte über PCR mit den in 2.6.1 beschriebenen Primern. Abbildung 9 zeigt das Konstrukt auf DNA-Ebene.

RT1B¹ MBP₇₁₋₉₀ Fusionsmolekül (β -Kette):

```

atg gct ctg cag acc ccc agc ttc ctc ctc cca gca gct gtg gtt gtg ctg
M  A  L  Q  T  P  S  F  L  L  P  A  A  V  V  V  L
<-----Signalpeptid----->

atg gtg ctg agc agc cca ggg act gag ggc ctg ccc cag aag tcg cag agg
M  V  L  S  S  P  G  T  E  G  L  P  Q  K  S  Q  R
-----> <----->

tcc caa gat gaa aac cca gta gtc cac ttc ttc gct agc gga ggg ggc gga
S  Q  D  E  N  P  V  V  H  F  F  A  S  G  G  G  G
-----MBP 71-90 peptid-----> <-----linker----->

agc ggc gga ggg aga gac tcc cca agg gat
S  G  G  G  R  D  S  P  R  D
-----> <---- $\beta$ 1 domäne----->

```

Abb. 9: RT1B¹ β -Kette mit kovalentem MBP₇₁₋₉₀ Peptid via Linker

Gezeigt ist die Verknüpfung der Genbereiche auf DNA-Ebene und ebenfalls die daraus resultierende Aminosäuresequenz.

4.2.3. Expression der RT1B¹ α V38M Variante mit RT1B¹ β MBP₇₁₋₉₀ Peptid

Nach erfolgreicher Generierung mittels PCR und Sequenzkontrolle wurde das neu entstandene RT1B¹ β -Ketten Molekül direkt 5' über eine NcoI und 3' über eine BamHI Schnittstelle in den retroviralen Expressionsvektor SFG-S65T kloniert, anschließend mit der Mutante V38M der RT1B¹ α -Kette kotransfiziert und in verschiedenen Zelllinien exprimiert.

Der Nachweis der Oberflächenexpression erfolgte mittels dem RT1B¹ β spezifischen mAb Ox-6 in der Immunfluoreszenzanalyse (FACS).

Dabei zeigten sich bei der M12C3 Zelllinie nur leichte Unterschiede in der Oberflächenexpression in Abhängigkeit der mit der V38M Variante der RT1B¹ α -Kette kotransduzierten β -Ketten (mit/ohne kovalentes MBP₇₁₋₉₀ Peptid). Jedoch zeigte die Substitution V38M der RT1B¹ α -Kette in der P80 Zelllinie teilweise eine deutliche Erniedrigung in der Oberflächenexpression im Vergleich zur Wildtyp (=wt) Expression. Diese konnte jedoch durch eine Koexpression der V38M Mutante mit RT1B¹ β MBP₇₁₋₉₀ behoben werden und dabei den Grad der RT1B¹ wt Expression erreichen (Abbildung 10+12). Generell zeigen sich die Expressionen der beiden RT1B¹ α -Ketten (wt/Mutante) durch die Koexpression mit RT1B¹ β MBP₇₁₋₉₀ verbessert und übertrafen teilweise sogar das Niveau der RT1B¹ wt Expression (Abbildung 10+12). Durch den flexiblen Aminosäurelinker scheint das Peptid förmlich in die Antigenbindungsgrube gezwungen zu werden und somit können auch gewisse sterische Hinderungen, welche zum Verlust der Funktionalität führen, überwunden werden.

In einem Titrationsexperiment, bei dem sowohl humane Raji, als auch murine P80 Zellen mit unterschiedlichen Virustitern (1ml, 0.5ml und 0.1ml Virusüberstand) der SFG-RT1B¹ / α V38M und SFG- RT1B¹ / β Vektoren kotransduziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpressionsstärke von RT1B¹ unabhängig von der Anzahl der infizierten Zellen ist. Dies belegt, dass die gemessenen Oberflächenexpressionen der verschiedenen RT1B¹ Varianten per se Virustiter unanabhängig sind.

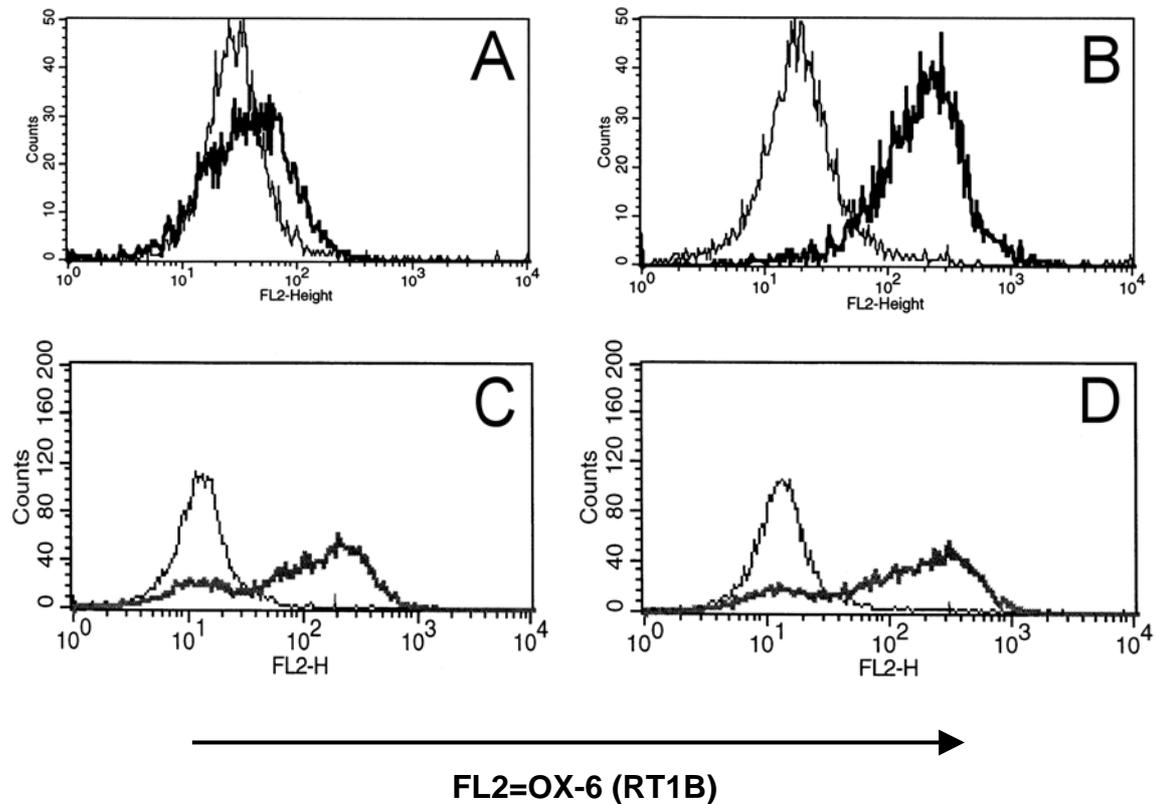


Abb. 10: Oberflächenexpression von RT1B¹ α V38M auf den jeweiligen Zelllinien mit und ohne kovalentes MBP₇₁₋₉₀.

Über virale Vektoren wurden die Zelllinien und P80 (A+B) und M13.C3 (C+D) parallel mit der RT1B¹ α V38M- und β -Kette +/- kovalentem MBP₇₁₋₉₀ transduziert.

Die Expression des MHC Moleküls wurde über direkte Immunfluoreszenzanalyse (FACS) mit dem RT1B¹ β spezifischen mAb OX6-PE nachgewiesen. Die Histogramme mit dicker Linie zeigen die OX-6 nach Expression von RT1B α V38M mit nativer β -Kette (A+C), die Histogramme B und D zeigen die OX-6 Bindung nach Expression von RT1B α V38M mit β MBP₇₁₋₉₀. Unspezifische Bindungen wurden durch den isotypidentischen Kontrollantikörper V65-PE ausgeschlossen (dünne Linie).

4.2.4. Funktionelle Charakterisierung der RT1B¹ α V38M Variante mit kovalentem MBP₇₁₋₉₀ Peptid

Nachdem die Oberflächenexpression der transduzierten RT1B¹ Variante über Immunfluoreszenz nachgewiesen war, wurden die mit SFG-RT1B¹- α V38M und SFG-RT1B¹- β MBP transduzierten Zelllinien auf ihre Fähigkeit T-Zellhybridome zu stimulieren getestet, um einen Effekt des kovalenten MBP₇₁₋₉₀ Peptids überprüfen zu können. Als Maß für die stimulatorische Kapazität der mit RT1B¹ transduzierten Zelllinien diente die nach der Stimulation erreichte IL-2 Produktion des T-Zellhybridoms 35/1, welches in den IL-2 Tests verwendet wurde (Abbildung 11).

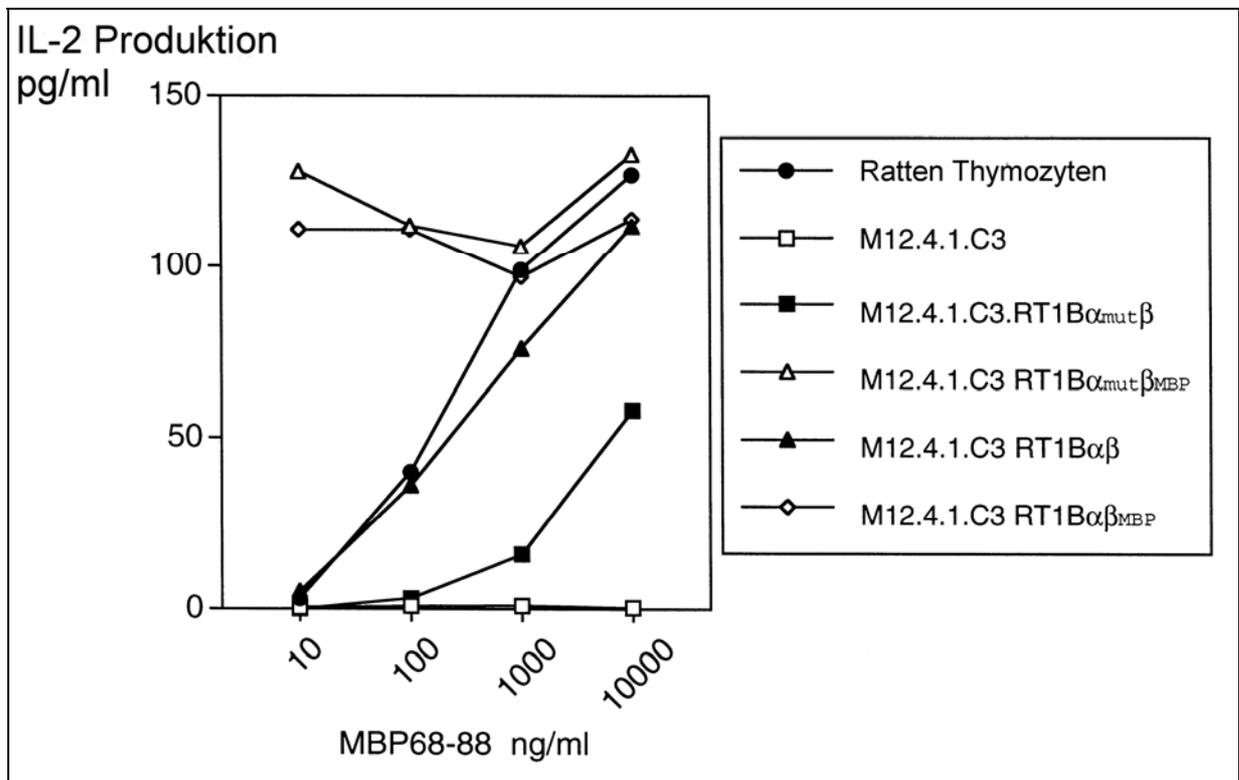


Abb. 11: RT1B¹ V38M (+/- kovalentes MBP₇₁₋₉₀) transgene M12.C3 Zellen präsentieren dem T-Zellhybridom 35/1 das Antigen MBP₇₁₋₉₀

35/1 Zellen wurden für 48h in 96 well Platten mit den gezeigten Konzentrationen an Peptid inkubiert. Als APC wurden 5×10^4 der gezeigten Zelllinien oder 1×10^6 LEW T-Lymphozyten als Kontrolle eingesetzt.

Die Stimulationsfähigkeit wurde über die Induktion der IL-2 Sekretion mittels ELISA bestimmt (OptEIA für Maus IL-2).

Die Stimulationsdaten aus Abbildung 11 belegen, dass die RT1B¹ V38M Variante mit kovalentem MBP₇₁₋₉₀ funktionell in der Lage ist, das Hybridom 35/1 effektiv zu stimulieren.

Nachdem gezeigt wurde, dass die kovalente Bindung des Antigenpeptides, bestimmte, noch zu klärende Defekte der Antigenpräsentation korrigieren kann, sollte überprüft werden, inwieweit Zelllinien, die RT1B¹ Moleküle mit kovalent verbundenen Peptidkomplexen exprimieren, im vorliegenden Fall also RT1B¹ MBP₇₁₋₉₀ Komplexe, therapeutisch genutzt werden könnten.

4.3. Effekte von RT1B¹ exprimierenden murinen Mastozytomazellen in der AT-EAE

Für die folgenden Untersuchungen wurde hier das P80-System eingesetzt. Weiterhin wurden die Gene des MHC-Klasse II Molekül RT1B¹, retroviral transferiert und diese transgenen Zellen mit dem enzephalitogenem Peptidepitop von MBP₆₈₋₈₈ beladen (auch kovalent gebunden, MBP₇₁₋₉₀, siehe oben). Daraufhin wurden die möglichen therapeutischen Effekte dieser Zellen im klinischen Verlauf der EAE, nach adoptivem Transfer, charakterisiert und analysiert. Diese Versuche wurden gemeinsam mit Dr. A. Weishaupt und Prof. R. Gold von der neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg durchgeführt.

4.3.1. P80 Zellen für *in vivo* Versuche exprimieren RT1B^I mit und ohne kovalentes MBP₇₁₋₉₀

P80 Zellen wurden wie unter 4.1. und 4.2.2. generiert und über das in 3.2.10. beschriebene retrovirale Vektorsystem auf den genannten Zelllinien exprimiert (siehe Abbildung 12).

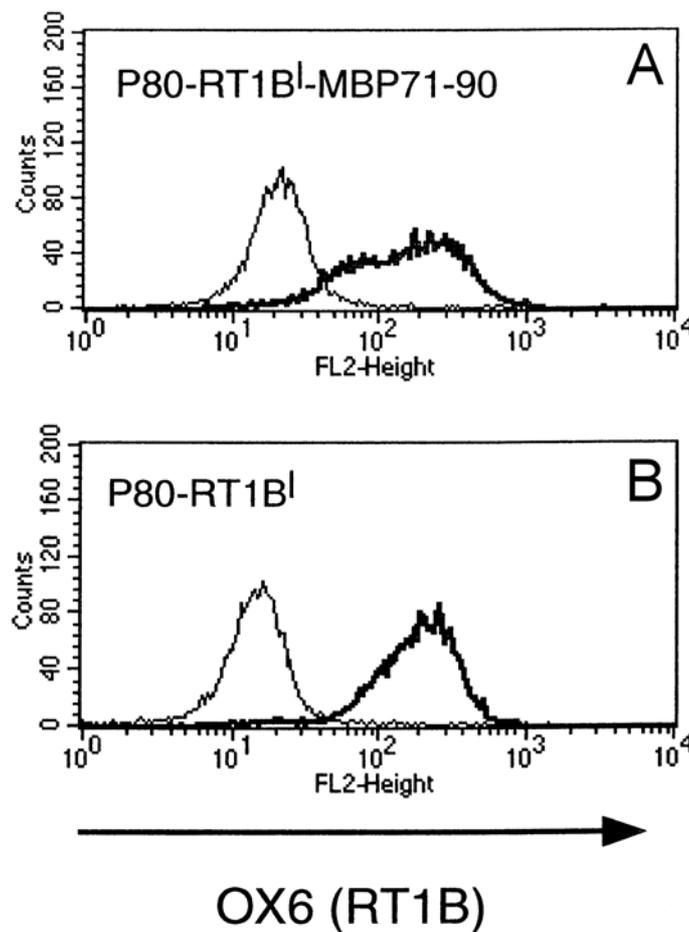


Abb. 12: Oberflächenexpression von RT1B^I mit und ohne kovalentes MBP₇₁₋₉₀ der transgenen P80 Zellen.

Über virale Vektoren wurden die P80 Zellen parallel mit der RT1B^I α - und β -Kette transduziert.

Die Expression des MHC Moleküls wurde über direkte Immunfluoreszenzanalyse (FACS) mit dem RT1B^I β spezifischen mAb OX-6-PE nachgewiesen. Die Histogramme mit feiner Linie zeigen die OX6 Bindung vor der Transduktion, die Histogramme mit dicker Linie (grün) zeigen die OX-6 Bindung nach Transduktion. P80 RT1B Zellen sind in A gezeigt, P80RT1B-MBP₇₁₋₉₀ Zellen in B. Unspezifische Bindungen wurden durch den isotyp-identischen Kontrollantikörper V65-PE ausgeschlossen (nicht gezeigt).

4.3.2. Effekte der transgenen MHC Klasse II-CD80 positiven Zellen auf den Krankheitsverlauf einer AT-EAE

Um die klinischen Effekte der verwendeten transgenen Zelllinien im Verlauf einer durch adoptiven Transfer (AT) ausgelösten EAE zu untersuchen erhielten jeweils 6 Versuchstiere eine einmalige Injektion von 2.5×10^5 oder 10^6 P80-RT1B¹ bzw. P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen und eben so vielen Kontrollzellen am Tag 2 der beginnenden EAE in die Schwanzvene, nach dem Transfer von drei Tagen zuvor stimulierten MBP13 T-Zellen. Eine Gruppe von Kontrolltieren erhielt als Injektion nur PBS.

Die so behandelten Ratten wurden an bestimmten Tagen gewogen und täglich auf klinische Krankheitssymptome untersucht. Der Grad der EAE wurde über den folgenden Standard festgesetzt: 0= normal, 1= hinkend, 2= leichte Lähmung der hinteren Extremitäten, 3= mittlere Lähmungserscheinungen, 4= Paraplegie oder Tetraparese, 5= Moribund.

AT-EAE Ratten, die nur eine PBS Injektion erhielten entwickelten schwere Symptome der Krankheit, wobei das Maximum an Tag 4 bzw. 5 anhand von Paraplegie oder Tetraparese vorlag (Abbildung 13). Versuchstiere, die mit 2.5×10^5 bzw. 10^6 P80-RT1B¹ Zellen behandelt wurden, zeigten einen ähnlichen Krankheitsverlauf. Die Administration gleicher Dosen P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen führte jedoch zu einer signifikanten benignen Effekt auf den Krankheitsverlauf der AT-EAE verglichen mit den Kontrolltieren.

Anhand dieser *in vivo* Daten, konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsantwort MBP spezifische T-Zellen abhängig von der Präsenz des MHC Klasse II Moleküls RT1B¹ und dem Antigen MBP₇₁₋₉₀ ist. Die Verabreichung dieser Zellen führte im klinischen Verlauf einer AT-EAE zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheitssyndrome.

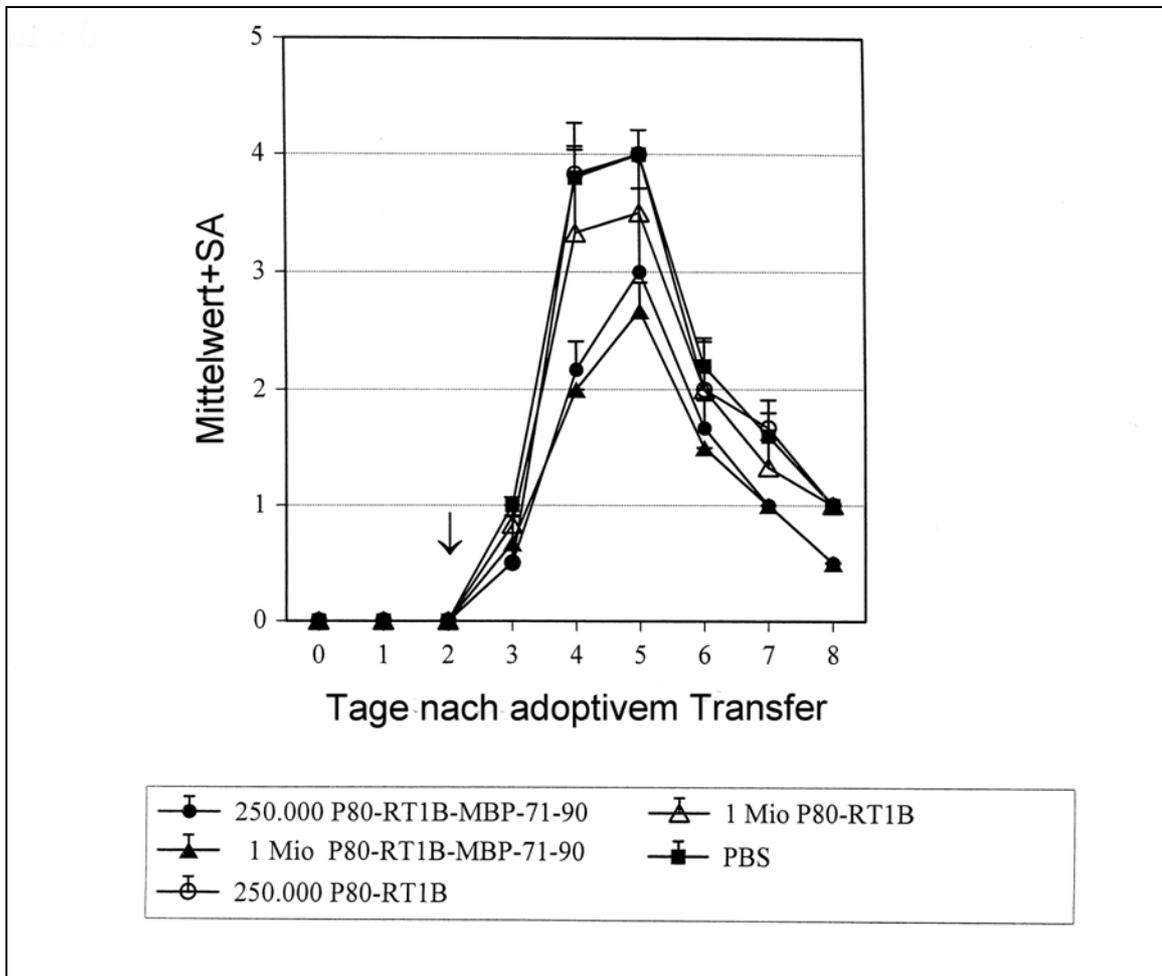


Abb. 13: Klinischer Verlauf einer AT-EAE nach Administration RT1B¹ transgener P80 Zellen

Dargestellt ist das klinische Ergebnis mit den gezeigten Zelllinien nach einmaliger Injektion von 2.5×10^5 und 10^6 P80-RT1B¹ bzw. P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen und eben so vielen Kontrollzellen am Tag 2 der beginnenden EAE.

4.4. Generierung neuartiger RT1B¹ „Singlechain“ Konstrukte

Als alternativer Ansatz zur Charakterisierung der MHC/TCR Interaktion und zur Erkennung und Modulation RT1B¹ spezifischer T-Zellen, sollten zellgebundene RT1B¹ Singlechain-Moleküle generiert werden. Von Interesse waren dabei sowohl die Eigenschaften dieser Moleküle in bezug auf Expressionsfähigkeit und Funktionalität, als auch im Vergleich zueinander.

In vielen Fällen kann die Produktion von löslichen multimeren Proteinen, durch genetisches Verbinden der Untereinheiten in ein einzelnes „Singlechain“ Molekül, verbessert werden. Diese Strategie ermöglicht die ausgeglichene Produktion der funktionellen Untereinheiten (Domänen) und erleichtert ihre Assoziation und korrekte Faltung. Zahlreiche Veröffentlichungen haben die Generation von Singlechain Antikörpern und TCR Molekülen beschrieben, bei denen flexible Polylinker die beiden variablen Untereinheiten verbindet (Husten et al., 1993 und Chung et al., 1994). Dieser Ansatz wurde auch für MHC Klasse I Moleküle angewandt (Godeau et al., 1992 und Mage et al., 1992). Dabei wurde die schwere Kette von Klasse I mit β_2m verbunden, was eine Produktion von Singlechain Molekülen ermöglichte, um Peptidbindung und T-Zellaktivierung zu untersuchen (Godeau et al., 1992, Mage et al., 1992, Ojcius et al., 1993, Abastado et al., 1993 und Abastado et al., 1995)

Basierend auf der Tatsache, dass die beiden extrazellulären Domänen von MHC Klasse II Molekülen genügen, um gebundenes Peptid dem TCR-CD4 Komplex zu präsentieren (Wettstein et al., 1991 und Burrows et al., 1997), wurde ein Singlechain Molekül als potientielles Detektionsmittel autoreaktiver T-Zellen generiert, bei dem an den C-Terminus der β_1 Domäne direkt die komplette reife α -Kette angefügt. Um das Singlechain Konstrukt zu vervollständigen, wurde hier ebenfalls das MBP₇₁₋₉₀-Peptid über ein 11aa großes Peptidbindungsstück kovalent an den N-Terminus der RT1B¹ β -Kette angefügt (siehe Abbildung 14 und 3.2.7.8.).

Dieses Molekül sollte dann auf seine mögliche Oberflächenexpression, sowie die stimulatorischen bzw. inhibitorischen Eigenschaften untersucht werden.

RT1B¹ Singlechain-Konstrukt I :

```

atg gct ctg cag acc ccc agc ttc ctc ctc cca gca gct gtg gtt gtg ctg
M  A  L  Q  T  P  S  F  L  L  P  A  A  V  V  V  L
<-----Signalpeptid----->

atg gtg ctg agc agc cca ggg act gag ggc ctg ccc cag aag tcg cag agg
M  V  L  S  S  P  G  T  E  G  L  P  Q  K  S  Q  R
-----> <----->

tcc caa gat gaa aac cca gta gtc cac ttc ttc gct agc gga ggg ggc gga
S  Q  D  E  N  P  V  V  H  F  F  A  S  G  G  G  G
-----MBP 71-90 Peptid-----> <-----linker----->

agc ggc gga ggg aga gac tcc cca agg gat / / acc tcc ctg egg egg ctt
S  G  G  G  R  D  S  P  R  D          T  S  L  R  R  L
-----> <-----β1 Domäne----->

act agt ggt ggc ggt ggc agc ggc ggt ggt ggt tcc gga ggc ggc ggt tct
T  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S
<-----single chain linker----->

ggc ggt ggc ggt tcc tcg agt gga ggt caa gac gac att / / cac cca ggg
G  G  G  G  S  S  S  G  G  Q  D  D  I          H  P  G
-----> <-----α1-α2 Domäne-Tm-Cy----->

ccc ctt tga
P  L  ***
----->

```

Abb. 14: RT1B¹ Singlechain Konstrukt I

Gezeigt ist die Verknüpfung der Genbereiche auf DNA-Ebene und ebenfalls die daraus resultierende Aminosäuresequenz.

Weiterhin wurde ausgehend von der Publikation von Rhode et al. 1996, in der gezeigt wurde, dass ein murines IA^d Singlechain Molekül, welches die komplette extrazelluläre β - und α -Ketten mit einem langen Aminosäurelinker verbindet, effektiv T-Zellantworten stimulieren, Zytokine freisetzen und Apoptose verursachen kann, ein zweites RT1B¹ Singlechain Molekül generiert. Dadurch sollte das existierende murine IA^d Modell auch im Rattensystem etabliert werden und ebenfalls der Einfluss des transgenen RT1B¹ Singlechain Moleküls auf die T-Zellstimulation untersucht werden.

Hierzu wurde im Subklonierungsvektor pCR2.1 der C-Terminus des extrazellulären Bereichs der RT1B¹ β -Kette über einen 24aa Linker via eine singuläre BspE1 Schnittstelle an den N-Terminus der reifen RT1B¹ α -Kette angefügt. Um das Singlechain Konstrukt zu vervollständigen, wurde hier ebenfalls das MBP-Peptid über ein 11aa großes Peptidbindungsstück kovalent an den N-Terminus der RT1B¹ β -Kette angefügt (Abbildung 15, siehe auch 3.2.7.8).

RT1B¹ Singlechain-Konstrukt II :

```

atg gct ctg cag acc ccc agc ttc ctc ctc cca gca gct gtg gtt gtg ctg
M  A  L  Q  T  P  S  F  L  L  P  A  A  V  V  V  L
<-----Signalpeptid----->

atg gtg ctg agc agc cca ggg act gag ggc ctg ccc cag aag tcg cag agg
M  V  L  S  S  P  G  T  E  G  L  P  Q  K  S  Q  R
-----> <----->

tcc caa gat gaa aac cca gta gtc cac ttc ttc gct agc gga ggg ggc gga
S  Q  D  E  N  P  V  V  H  F  F  A  S  G  G  G
-----MBP 71-90 Peptid-----> <-----linker----->

agc ggc gga ggg aga gac tcc cca agg gat / / gtc aca gtg gag tgg cgg
S  G  G  G  R  D  S  P  R  D          V  T  V  E  W  R
-----> <----- $\beta$ 1- $\beta$ 2 Domäne----->

act agt ggt ggc ggt ggc agc ggc ggt ggt ggt tcc gga ggc ggc ggt tct
T  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S
<-----single chain linker----->

ggc ggt ggc ggt tcc tcg agt gga ggt caa gac gac att / / cac cca ggg
G  G  G  G  S  S  S  G  G  Q  D  D  I          H  P  G
-----> <----- $\alpha$ 1- $\alpha$ 2 Domäne-Tm-Cy----->

ccc ctt tga
P  L  ***
----->

```

Abb. 15: RT1B¹ Singlechain Konstrukt II

Gezeigt ist die Verknüpfung der Genbereiche auf DNA-Ebene und ebenfalls die daraus resultierende Aminosäuresequenz (siehe 2.6.1.).

Nach der erfolgreichen Klonierung wurden beide transgene RT1B¹ Singlechain Moleküle sequenziert und anschließend in BW58C, Raji und P80 Zellen über das in 3.2.10. beschriebene retrovirale Vektorsystem transduziert. Dabei konnte bis zum Zeitpunkt der Untersuchung über Immunfluoreszenz keine Bindung des für die β -Kette von RT1B¹ spezifischen mAb OX-6 und somit keine Oberflächenexpression festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob das rekombinante Molekül zwar die richtige Konformität erreicht, jedoch der Export aus der Zelle blockiert ist, wurde ein Immunoblot, wie unter 3.3.13 und 3.3.14 beschrieben von Zellysaten Singlechain Molekül I transduzierter Rajizellen durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurden 2×10^6 natives RT1B¹ exprimierende Rajizellen, als Negativkontrolle 2×10^6 untransfizierte Rajizellen eingesetzt.

Dabei konnte im Fall des Singlechain Moleküls I anhand des Westernblots mit dem RT1B¹ β spezifischen mAb OX-6 im Zellysat von Rajizellen, welche mit dem Singlechain Molekül I transduziert wurden, eine deutliche Bindung des Antikörpers (erwartete Bande bei ca. 42kd) nachgewiesen werden (Abbildung 16). Bei der Positivkontrolle ist die RT1B¹ Bande (ca. 66kd) ebenfalls gut zu erkennen. Dies lässt zumindest auf ein funktionelles Epitop des monoklonalen Antikörpers OX-6 des Moleküls im Zellinnern schließen.

Für das Singlechain Molekül II wurden Untersuchungen derselben Art durchgeführt. Hier wurde weder eine Expression der Oberflächenmoleküle gefunden, noch ließ sich im Immunoblot OX-6 bindenes Material mit dem erwarteten Molekulargewicht nachweisen. Im Rahmen der vorgelegten Dissertation war es nicht mehr möglich die erfolgreiche Transduktion des Genes bzw. seine Expression auf mRNA Ebene zu überprüfen. Deshalb können z.Zt. keine Aussagen über die Funktionalität des Singlechain Konstruktes II getroffen werden. Trotzdem bieten sich diese einfachen Moleküle für Gentherapiestudien an, da nur ein Gen transduziert werden muss und die Generierung relativ einfach ist.

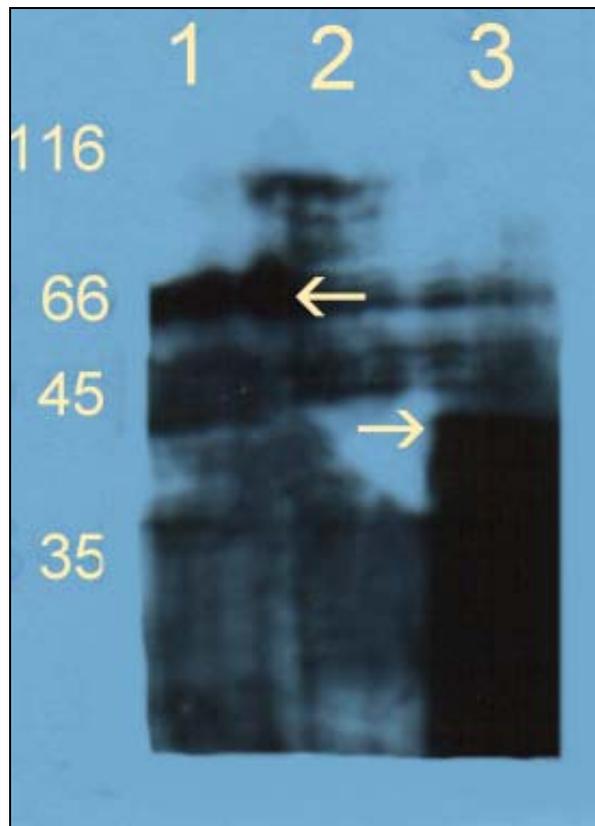


Abb. 16: Zellysat-Westernblot der mit Singlechain Molekül I transduzierten Rajizellen

Das Zellysat von jeweils 2×10^6 Rajizellen, transduziert mit nativem RT1B¹ (1) und dem Singlechain Molekül I (3) wurden in einem Westernblot auf die Bindung des RT1B¹ spezifischen mAb Ox-6 untersucht. Untransfizierte Rajizellen dienten als Negativkontrolle. Gezeigt ist der Blot nach 10min Entwicklung mit dem ECL-Kit(2).

4.5. Antigenbindung eines löslichen $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts von RT1B¹ und Modulation der T-Zellaktivierung

Zu den oben genannten Singlechain Molekülen, wurde als neuer, vielversprechender Ansatz, basierend auf einer Publikation von Burrows et al. 1997 ein lösliches $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukt von RT1B¹ generiert, bei dem der N-Terminus der β -Kette direkt mit dem C-Terminus der α -Kette verbunden wurde, auf die Fähigkeit spezifisches Autoantigen zu binden und die T-Zellantwort zu modulieren untersucht. In der Publikation wurde gezeigt, dass dieses $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukt von RT1B¹ spezifisch mit MBP als Antigen beladen werden kann, ohne zusätzliche Oligomerisierung an T-Zellen bindet und diese Bindung direkt über den RT1B¹ β -Ketten spezifischen mAb OX-6 nachgewiesen werden kann. Dies führte zu einer spezifischer Erkennung von T-Zellen und darüber hinaus zu einer verminderten Aktivierungsfähigkeit der MBP reaktiven T-Zellen in einer IL-2 reversiblen Art. Weiterhin konnte durch den Einsatz des $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstruktes von RT1B¹ klinische Symptome einer EAE teilweise supprimiert werden. Diese Daten zeigten, dass das $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukt von RT1B¹ als ein simplifizierter natürlicher TCR Ligand funktioniert, mit starker inhibitorischer Aktivität. Interessant erscheint auch die Tatsache, dass keine weiteren Signale der $\alpha 2$ und $\beta 2$ Domänen dazu erforderlich sind.

Da diese neue Klasse kleiner löslicher Polypeptide ein Werkzeug für im Rattensystem einsetzbare Moleküle darstellt, um potentiell autoreaktive T-Zellen zu detektieren und zu regulieren, sollte dieses System auch in unserem Labor etabliert werden. Weiterhin sollte es auch zum Etablieren der für die Reinigung (FPLC) und zur Renaturierung benötigten Techniken führen.

Darüber hinaus sollten die Eigenschaften dieses monomeren rekombinanten Moleküls direkt mit MHC Klasse II Multimeren, besonders von RT1B¹, verglichen werden. Dazu wurde eine Kooperation mit Dr. Dirk Busch in München initiiert, wobei über ein Baculovirus/Insektenzellensystem monomere RT1B¹ Untereinheiten löslich produziert werden sollen, welche anschließend multimerisiert in Bindungsstudien eingesetzt werden sollen. Zum momentanen Zeitpunkt sind die Klonierungsschritte abgeschlossen, und erste Expressionsversuche zur Identifikation hoch exprimierender Klone der monomeren Untereinheiten sind in Arbeit.

4.5.1. Generierung des RT1B¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts

Die Generierung des β 1 α 1-Domänen Konstrukt erfolgte in mehreren Schritten. Dazu wurden chimäre Primer, welche unter 2.6.1 beschrieben sind, in einer PCR eingesetzt. Schritt eins generierte dabei die cDNA der β 1 und α 1 Domänen über 28 Zyklen mit den folgenden Parametern: Denaturation für 20s bei 95⁰C, Anlagerung für 1.5min bei 55⁰C und Extension für 1.5min bei 72⁰C. Danach wurden die so amplifizierten Produkte über ein Agarosegel isoliert und gereinigt. In Schritt zwei wurden die so gereinigten β und α PCR Produkte im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt (jeweils ca. 500ng) und ohne zusätzliche Primer für 5min bei 95⁰C denaturiert. Darauf folgen zwei Zyklen Denaturation für 1min bei 95⁰C, Annealing für 2min bei 60⁰C und Extension für 5min bei 72⁰C. In diesem Schritt erfolgte über die anfänglich eingesetzten chimären Primer eine Überkreuzverbindung der vier unterschiedlichen singulären DNA Stränge und in dessen Folge eine Elongation der chimären, doppelsträngigen DNA über die DNA-Polymerase. In Schritt drei wurden die so elongierten PCR Produkte in 26 Zyklen für 5min denaturiert bei 95⁰C, ein Anlagerung erfolgte in Gegenwart der in der ersten PCR eingesetzten α und β Primer für 1min bei 60⁰C mit einer anschließenden Extension für 1min bei 72⁰C.

Das fertige PCR Produkt des β 1 α 1-Domänen Konstrukts wurde danach über ein Agarosegel gereinigt und isoliert. Die Überprüfung des Konstrukts erfolgte über Sequenzanalyse (siehe auch Burrows et al. 1997).

4.5.2. Reinigung des RT1B¹ β 1 α 1-Domänen Konstrukts

Das so erhaltene β 1 α 1-Domänen Konstrukt wurde über über NcoI und BglII direkt in den prokaryotischen Proteinexpressionsvektor pET-3a kloniert und anschließend in den *E.coli* Stamm BL21(DE3) transformiert (siehe auch 3.3.1). Nach Überprüfung der Klone wurde bei einem Klon die Expression des rekombinanten Proteins mittels IPTG, wie unter 3.3.2 beschrieben, induziert, was zur Bildung von Inclusion Bodies des ca.22kD großen rekombinanten Proteins führte. Ab diesem Schritt wurden alle Arbeiten in 4⁰C durchgeführt. Die folgende Reinigung des rekombinanten Proteins wird exemplarisch anhand eines kompletten Ablaufs, ausgehend von 1l Bakterienkultur, dargestellt:

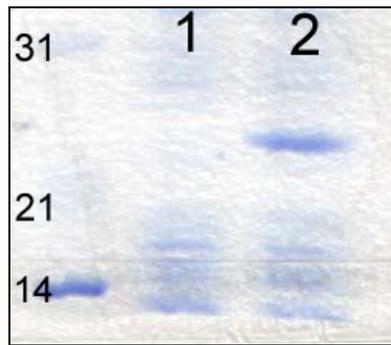


Abb. 17:

12%iges SDS-PAGE Gel mit Größenmarker. Spur 2 zeigt die induzierte Proteinbande nach 3h Inkubation nach 4mM IPTG Induktion. Aufgetragen wurden jeweils die Pellets aus 500 μ l Proben.

Die in Abbildung 17 dargestellte IPTG Induktion führte zu einem Gesamtgehalt von ca.23mg/l rekombinantes Protein aus 1l Bakterienkultur. Deutlich erkennbar ist die induzierte Proteinbande in Spur 2 mit der ungefähren Größe des rekombinanten β 1 α 1-Domänen Konstrukts (ca. 22kD). Um noch Verunreinigungen durch Präzipitate zu verringern, wurden die Proben dreimal in eiskaltem PBS gewaschen (je 5ml kaltem PBS mit pH10) und dann in 5ml 6M Harnstoff/20mM ETOHamin pH10 bei 4⁰C überführt (3.3.3.). Der Gesamtproteingehalt betrug nach diesem Schritt ca. 21mg/l. Anschließend wurde mittels FPLC eine Ionen-Austausch-Chromatographie mit einem von Stufengradient von 0-1M NaCl pH10 durchgeführt (Abbildung 18)(3.3.4.), und verschiedene eluierte 2ml Fraktionen auf ihren Proteingehalt bzw. Reinheitsgrad in einem Proteingel untersucht (Abbildung 19). Dabei ist auf dem Ausdruck der FPLC die Elution des rekombinanten Proteins deutlich erkennbar. Jedoch zeigt sich auf dem Gelphoto der eluierten Fraktionen, dass während der Elution des Proteins aus der Säule, ebenfalls Verunreinigungen eluiert wurden, die jedoch durch Sammeln der reinsten eluierten Fraktionen deutlich verringern ließen.

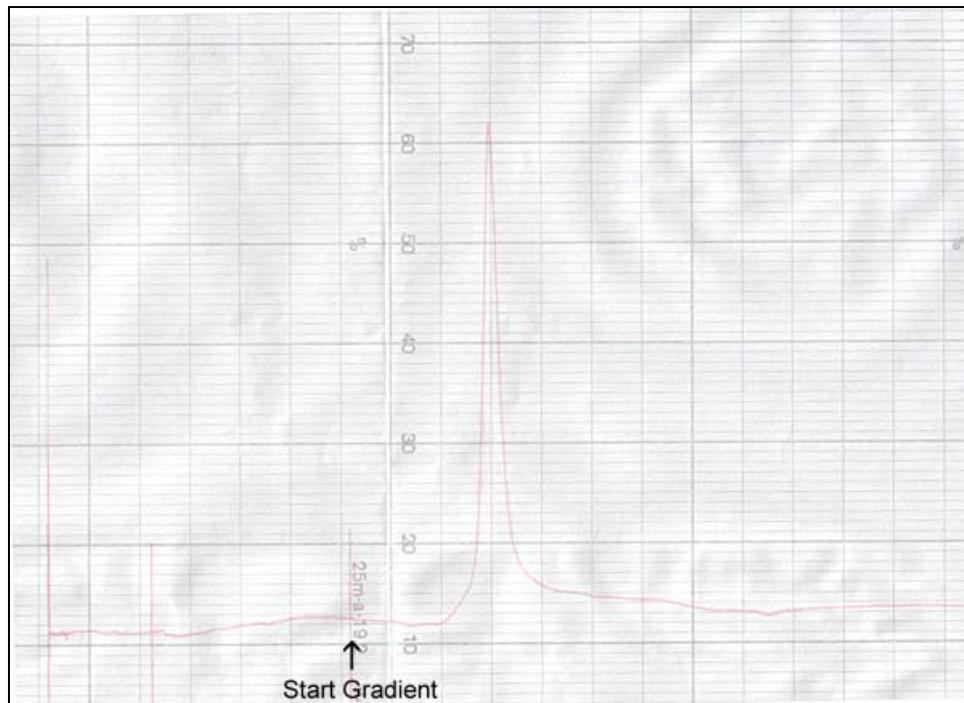


Abb. 18: FPLC-Ausdruck des gereinigten Proteins

Die Anionen-Austauschchromatographie wurde bei 4°C unter Verwendung einer XK26/16 Säule, beladen mit dem Anionen-Austausch Medium Source 30 (30ml), durchgeführt. Die zu trennenden Proteinkomponenten wurden auf die mit 6M Harnstoff und 20mM Ethanolamin äquilibrierte Säule aufgetragen und mittels einem 1M NaCl Hochsalzpuffer unter Verwendung eines programmierten Stufenradienten mit 0.2cm/ml eluiert. Die Detektion der eluierten Fraktionen erfolgte durch die Messung der Absorbtion bei 280 nm mit einer AU von 0.2. Aliquots ausgewählter Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

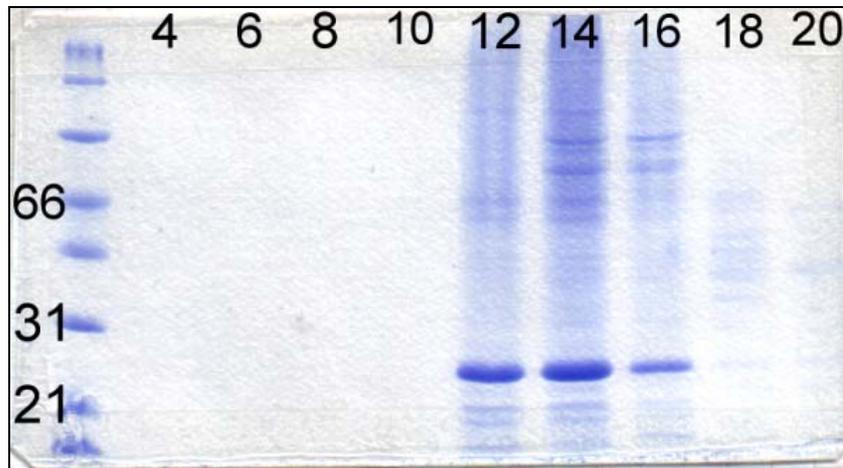
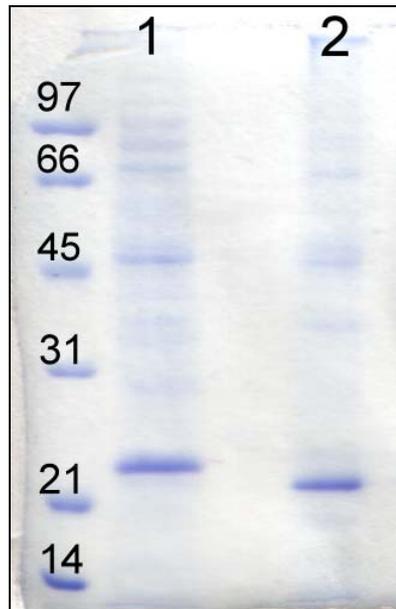


Abb. 19:

12%iges SDS-PAGE Proteingel mit Größenmarker. Gezeigt sind in den jeweiligen Spuren, die entsprechenden über FPLC eluierten 2ml Fraktionen (10 μ l Probenauftrag).

Nach dem Sammeln der relevanten eluierten Fraktionen (hoher Proteingehalt, geringe Verunreinigungen: 10ml Gesamtvolumen) und erneuter Quantifizierung der Proteingesamtmenge, wurde festgestellt, dass die Ionenaustausch-Chromatographie einen hohen Verlust an Protein darstellt. Die Proteinmenge betrug nach diesem Schritt noch ca. 12mg/l.

Zur Durchführung eines Pufferwechsels in PBS wurde eine Dialyse, wie unter 3.3.5. beschrieben, durchgeführt und das Material mittels 10kD Ultrafiltrationseinheiten auf 1ml Gesamtvolumen konzentriert. Dieser Schritt war sehr kritisch, da hierbei die Rückfaltung des denaturierten Proteins in seine funktionelle Konformation erfolgen soll. Die erfolgte Renaturierung intramolekularer Disulfidbrücken zweier Cysteinreste wurde durch Vergleich des gereinigten Materials in einer reduzierenden bzw. nicht reduzierenden SDS-PAGE, nachgewiesen (Abbildung 20). Dabei war ein Größenunterschied deutlich erkennbar. Das entfaltete Protein lief langsamer im Gel, als das renaturierte Protein.

**Abb. 20:**

12%iges SDS-PAGE Proteingel mit Größenmarker zur biochemischen Erkennung interner gefalteter Disulfidbrücken des rekombinanten Proteins. Spur 1 zeigt 10 μ l Probe unter reduzierenden Bedingungen (+ β -Mercapthoethanol). Spur 2 zeigt ebenfalls 10 μ l unter nicht reduzierenden Bedingungen (- β -Mercapthoethanol).

Nun folgte eine zweite Reinigung des rekombinanten Proteins über Gelfiltration mit Superdex 75 (3.3.6.). Dabei wurde 1ml Probe aufgetragen und anschließend in Fraktionen eluiert (Abbildung 21). Der Elutionszeitpunkt (Größe) des rekombinanten Proteins im Vergleich zu Markerproteinen deutet auf eine monomere Form hin. Der Proteingesamtgehalt betrug nach der 2. Säule ca. 7mg/l in einem Gesamtvolumen von ca. 2ml. Auch hier wurde mittels 10kD Ultrafiltrationseinheiten das Gesamtvolumen auf ca. 200 μ l verringert, um eine bessere Beladung der Zellen mit dem rekombinanten MHC Molekül zu gewährleisten (3.3.7.) (siehe auch Burrows et al. 1997). Abbildung 22 zeigt das gereinigte rekombinante MHC Molekül mit einem Endgehalt von ca.6mg/l. Eine Gesamtquantifizierung der einzelnen Schritte erfolgte zusätzlich mittels Bradford Proteinbestimmung.

Das in der hier beschriebenen Weise gewonnene Material wurde zunächst auf einem Proteingel analysiert und anschließend auf seine Fähigkeit antigenes Peptid zu binden, bzw. nach Peptidbeladung an zelloberflächenexprimierte TCR zu binden, getestet.

Abschließend wurde das rekombinante Protein nochmals auf einem Proteingel analysiert und danach in einem Peptid/Zell-Bindungsassay zur Überprüfung der Bindungsfähigkeit an den TCR eingesetzt.

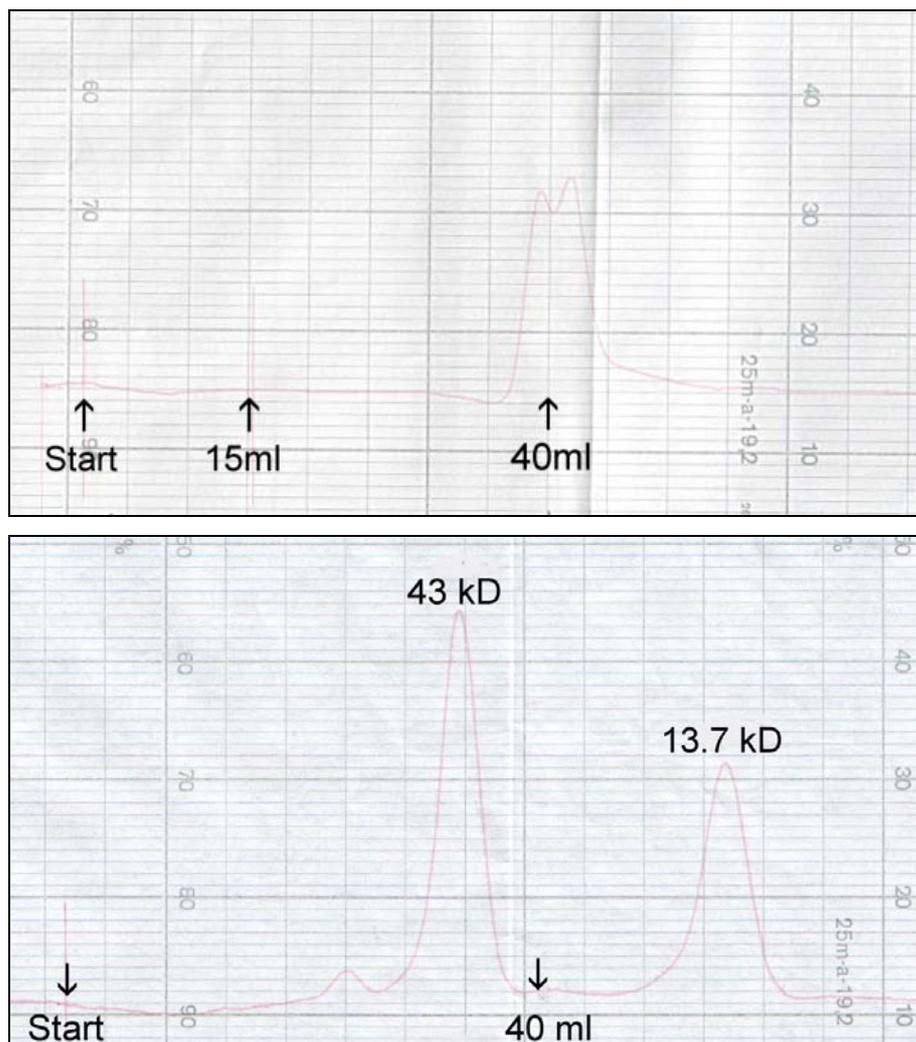


Abb. 21: Gelfiltration des rekombinanten MHC Moleküls

Die Gelfiltration wurde bei 4 °C unter Verwendung einer HR16/60 Säule, beladen mit dem Medium Superdex, durchgeführt. Die zu trennenden Proteinkomponenten wurden auf die mit PBS äquilibrierte Säule aufgetragen und eluiert. Die Detektion der eluierten Fraktionen erfolgte durch die Messung der Absorption bei 280 nm (AU0.2, 0.2cm/ml). Anhand des Ausdrucks erkennt man die Elution des gereinigten Proteins (ca.22kD). Aliquots ausgewählter Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Die untere Abbildung zeigt die Elution der Markerproteine Ova (43 kD) und Ribose A (13.7 kD).

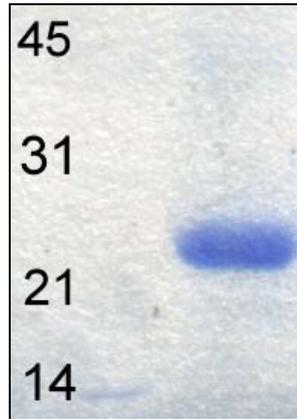


Abb. 22:

12%iges SDS-PAGE Proteingel zur abschließenden Analyse und Quantifizierung. Gezeigt sind 10 μ l des rekombinanten Proteins.

4.5.3. Das β 1 α 1-Domänen Konstrukt bindet im MHC-Peptid Assay spezifisch MBP

Um die funktionelle Integrität des so generierten β 1 α 1-Domänen Konstrukts zu überprüfen, wurde das rekombinante MHC Konstrukt jeweils mit MBP, OVA im 10fachen Überschuss beladen (1:10 molares Verhältnis). Dabei wurden bei RT jeweils 2,3mg/ml (1 μ M) MHC mit 10 μ M freiem Peptid beladen und für 24h inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes Peptid durch mehrfaches Waschen entfernt. Jeweils 10nM Peptid beladener MHC wurden daraufhin mit 5x10⁴ Zielzellen für 17h bei 4⁰C inkubiert. Nach drei Waschschritten, um freies Peptid zu entfernen, wurden die Zellen mit dem mAb Ox-6 für 30min. inkubiert, gewaschen und danach im FACS analysiert. Als Kontrollen dienten zum einen untransfizierte BW Zellen, als auch unbeladener rekombinanter MHC. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das T-Zellhybridom 35/1, als auch mit $\alpha\beta$ wt transfizierte BW Zellen spezifisch MBP beladenen MHC erkennen. Sowohl unbeladener, als auch mit dem Kontrollpeptid OVA beladener MHC wurde von beiden Zelltypen nicht gebunden. Die untransfizierten BW Zellen konnten wie erwartet keinen MHC Typ binden.

Die hier gezeigten Ergebnisse konnten in unserem Labor nicht mehr reproduziert werden, was an der generellen Instabilität solcher rekombinanter Moleküle liegen könnte, was eine Detektion der Bindung zeitlich sehr einschränkt.

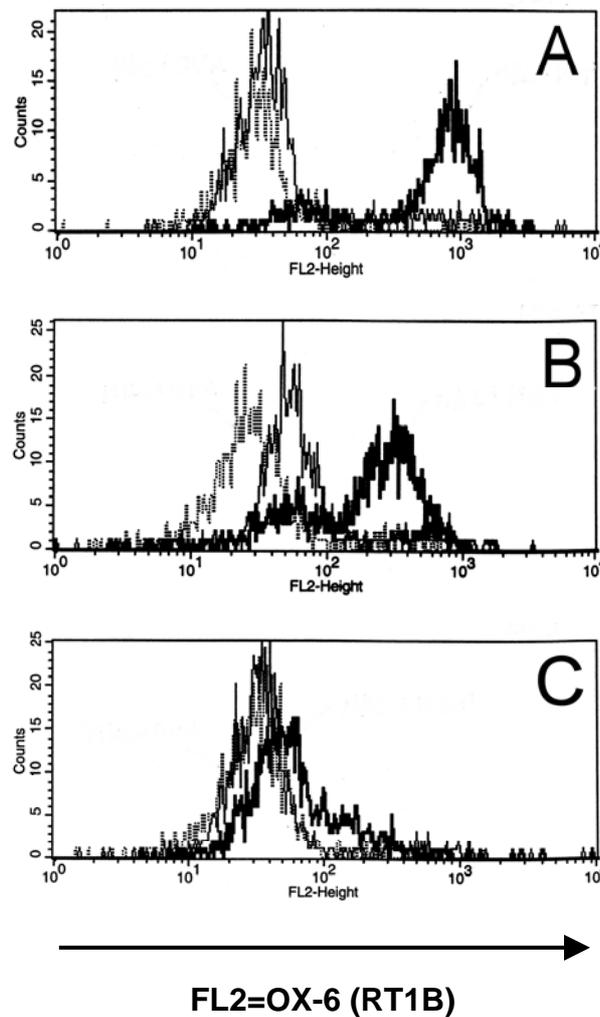


Abb. 23: MHC/Peptid Bindungsnachweis

Mit 10nM Peptid beladener MHC wurden mit 5×10^4 Zielzellen für 17h bei 4°C inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit dem mAb OX-6 für 30min. Als Kontrollen dienten zum einen untransfizierte BW Zellen, als auch unbeladener rekombinanter MHC. Unbeladener MHC ist als dünne Linie, OVA beladener MHC als normale Linie und MBP beladener MHC als dicke Linie dargestellt. A zeigt die Bindung an 35/1 Hybridomzellen, B zeigt die Bindung BW wildtyp Zellen und C die Bindung an untransfizierte BW Zellen.

4.6. Einsatz RT1B¹ und CD28 transduzierter Zelllinien zur Untersuchung des Beitrags der CDRs zur Super- und Antigen-spezifität von RT1B¹ restringierten BV8S2⁺ Zellen in der LEW-Ratte

Um die Antigen- und Superantigenerkennung von spezifischen T-Zellen besser zu charakterisieren wurden transgene RT1B¹ exprimierende Zelllinien auch in den folgenden Experimenten eingesetzt, um bisher auf diesem Gebiet in unserem Labor erzielte Ergebnisse zu ergänzen und den Beitrag der verschiedenen CDRs in der Reaktivität von BV8S2-positiven T-Zellen besonders bei der Erkennung von MBP als Antigen weiter zu untersuchen.

Die funktionellen Unterschiede und der Beitrag des jeweiligen CDR Bereichs besonders bei der Superantigenerkennung wurden teilweise bereits von Frau Dr. Anne Asmuß während ihrer Dissertation über Mutationsanalyse der TCR-Gene analysiert. Aufbauend auf diese Arbeiten sollten fortführend die funktionellen Unterschiede und der CDR Beitrag in bezug auf die Antigen-erkennung von MBP und des Superantigens YPM untersucht werden. Als Quelle der TCR-Gene diente dabei die enzephalitogene CD4-T-Zelllinie MBP13. Die Gene wurden jeweils in TCR negativen 58C TCR^{-/-} Mauseellen mit oder ohne Ratten CD28-Komplex exprimiert und die Reaktivität mit verschiedenen Zelllinien als APC getestet. Darunter befand sich auch die weiter oben beschriebene transgene RT1B¹ transduzierte Rajizelllinie.

4.6.1. Funktionelle Expression des gpMBP spezifischen T-Zellrezeptors 35/1 und seines Restriktionselements RT1B¹

Um eine verbesserte Reaktivität der T-Zelltransfektanten auf eine Stimulation mit Antigen zu erhalten, wurde der 35/1 TCR in das Derivat des TCR^{-/-} Maus-T-Zellhybridoms 58C, welches zusätzlich ein transgenes Maus/Ratten CD28 Konstrukt (58C-CD28) überexprimierte (Abbildung 25B) transduziert (siehe 2.9.). Die Oberflächenexpression des überexprimierten CD28 war im Vergleich zur nativen Expression der Zellen ca. eine log-Stufe höher (Abb. 25B1 und 25B2).

Abbildung 24 zeigt eine Gruppe von Experimenten mit 58C-CD28 transduzierten Zellen und RT1B¹ transduzierten Zellen (es wurden drei bis fünf Stimulationen für jeden Liganden durchgeführt), welche gpMBP₆₈₋₈₈ präsentieren, wobei die gezeigten Daten von dem jeweils gleichen Experiment stammen. Die TCR Gene wurden in 58C-CD28 Zellen transferiert, welche eine ähnliche TCR Expression zeigten (Abb.24). Das Auswachsen von TCR negativen Zellen wurde durch MACS-Sortierung von TCR positiven Zellen verhindert. Für die Stimulationen wurden zwei Typen von präsentierenden Zellen eingesetzt: Zum einen Thymozyten und zum anderen RT1B¹ transduzierte Raji Zellen. Thymozyten sind die klassischen APC für das Aufrechterhalten von MBP spezifischen Ratten T-Zelllinien.

In allen Fällen antwortete das Original T-Zellhybridom 35/1 am besten. Wildtyp (58C) und wt-CD28 Zellen antworteten ähnlich stark auf den CD3 Stimulus, jedoch erhöhte die CD28 Expression stark die Sensitivität bei der Antwort auf MBP, welches durch RT1B¹ transduzierten Rajizellen präsentiert wurde und mäßig, wenn MBP von Thymozyten präsentiert wurde. Die Antwort der Wildtyp-CD28 Zellen in bezug auf den gemessenen Schwellenwert war ähnlich für beide Typen von APC, aber die Wahl der APC hatte starken Einfluss auf die Antwort des 35/1 Hybridoms. In diesem Fall war die Stimulation deutlich besser mit verwendeten homologen APC (Ratten Thymozyten), im Vergleich zu heterologen APC (Raji-RT1B¹). Dieser Unterschied im Schwellenwert der Aktivierung könnte einen signifikanten Beitrag von speziesspezifischen Adhäsionsmolekülen oder kostimulatorischen Liganden bei der Aktivierung dieses T-Zellhybridoms aufzeigen.

In vorhergehenden Experimenten wurde ein BV8S2A1 (Hybridom TCR 35/1) tragender T-Zellrezeptor mit einer definierten Antigen- (Superantigen-spezifität) kloniert, exprimiert und in folgenden Experimenten mutagenisiert. Dies sollte zu einer Bestimmung des Beitrages der CDR2 und/oder CDR4 zur Reaktivität von BV8S2 und BV8S4 tragenden T-Zellrezeptoren gegenüber SEC1, MAS und YPM als Superantigenen und gpMBP, wenn auch in geringerem Umfang, als Peptidantigen dienen. Auf Seite der APC als MHC Klasse II tragender Zelle wurde ebenfalls RT1B¹ als das korrespondierende Restriktionselement für gpMBP und den TCR des Hybridoms 35/1 kloniert und exprimiert.

Über retroviralen parallelen Gentransfer der 35/1 TCR Gene wurde die gpMBP Spezifität (ganzes gpMBP und gpMBP₆₈₋₈₈) auf eine TCR^{-/-} Zelllinie (58C, siehe 2.7.) übertragen.

Abbildung 25B zeigt die Oberflächenexpression des Wildtyp TCR auf 58C Zellen. Der Anteil der über den mAk R73 in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Zellen betrug mindestens 80%.

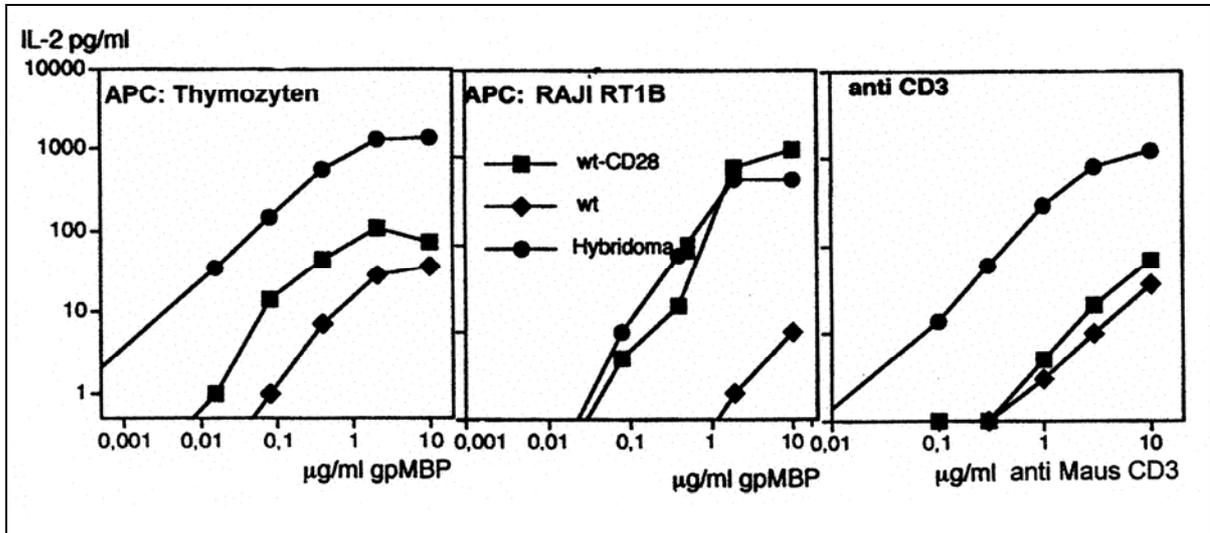


Abb. 24: CD28 Abhängigkeit der MBP Antwort des 35/1 TCR

Gezeigt ist die Antwort des 35/1 TCR ohne zusätzlich transduziertes CD28, mit überexprimiertem CD28 und dem T-Zellhybridom 35/1, auf eine Stimulation mit den angegebenen Mengen Peptid in 96well Flachbodenplatten, die mit den angegebenen Mengen an anti Maus CD3ε beschichtet wurden. Als APC wurden 1×10^6 /well Thymozyten oder Raji RT1B¹ Zellen verwendet. Die Stimulationsfähigkeit wurde über die Induktion der IL-2 Sekretion mittels ELISA bestimmt (Beckton&Dickinson, OptEIA für Maus IL-2).

Um die Untersuchungen der RT1B¹ restringierten gpMBP Antigenerkennung weiter zu charakterisieren und zu erleichtern, wurden ebenfalls, wie vorher ausgeführt, über retroviralen Gentransfer eine RT1B¹ exprimierende künstliche antigenpräsentierende Zelllinie generiert, wobei die α - und β -Kette kotransfiziert wurden (Abbildung 25C). Die dabei verwendeten RT1B¹ Gene wurden wie weiter oben unter 3.1. beschrieben mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend in den retroviralen Expressionsvektor SFG S-65T kloniert.

Die erhaltenen Reaktivitätsunterschiede in der Antigenantwort waren dabei abhängig von den jeweiligen benutzten APC. Bei homologen APC (Ratten Thymozyten) waren die Unterschiede geringer, als bei heterologen APC (RT1B¹ transgene Rajizellen) (siehe Abbildung 24). Allerdings begann die Antwort bei Rattenthymozyten als verwendeten APC eher als bei den heterologen RT1B¹ transduzierten Rajizellen APC. Diese Verschiebungen in den Schwellenwerten der Reaktivität zeigt möglicherweise auch die verminderte oder ganz fehlende Interaktion von spezifischen Adhäsionsmolekülen oder kostimulatorischen Liganden.

4.6.2. Beitrag der CDR2 und CDR4/HV4 zur Reaktivität der Antigen- und Superantigenerkennung des T-Zellrezeptors des Hybridoms 35/1

Zur besseren Analyse des Beitrags der CDR2 und CDR4/HV4 bei der Erkennung von gpMBP als Antigen und SEB/C1, MAS und YPM als Superantigene, wurde bereits von Fr. Dr. Asmuß eine spezifische Mutagenese (*site directed mutagenesis*, siehe 3.2.9.) der TCR β -Kette durchgeführt. Dabei wurde gezielt entweder die CDR2, die CDR4 oder die CDR2+CDR4 der BV8S2A1 tragenden β -Kette des 35/1 TCR durch die entsprechenden Bereiche des BV8S4 tragenden TCR substituiert. Abbildung 25A zeigt die Expression der TCR β -Ketten Mutanten im Vergleich mit Kontrollzellen.

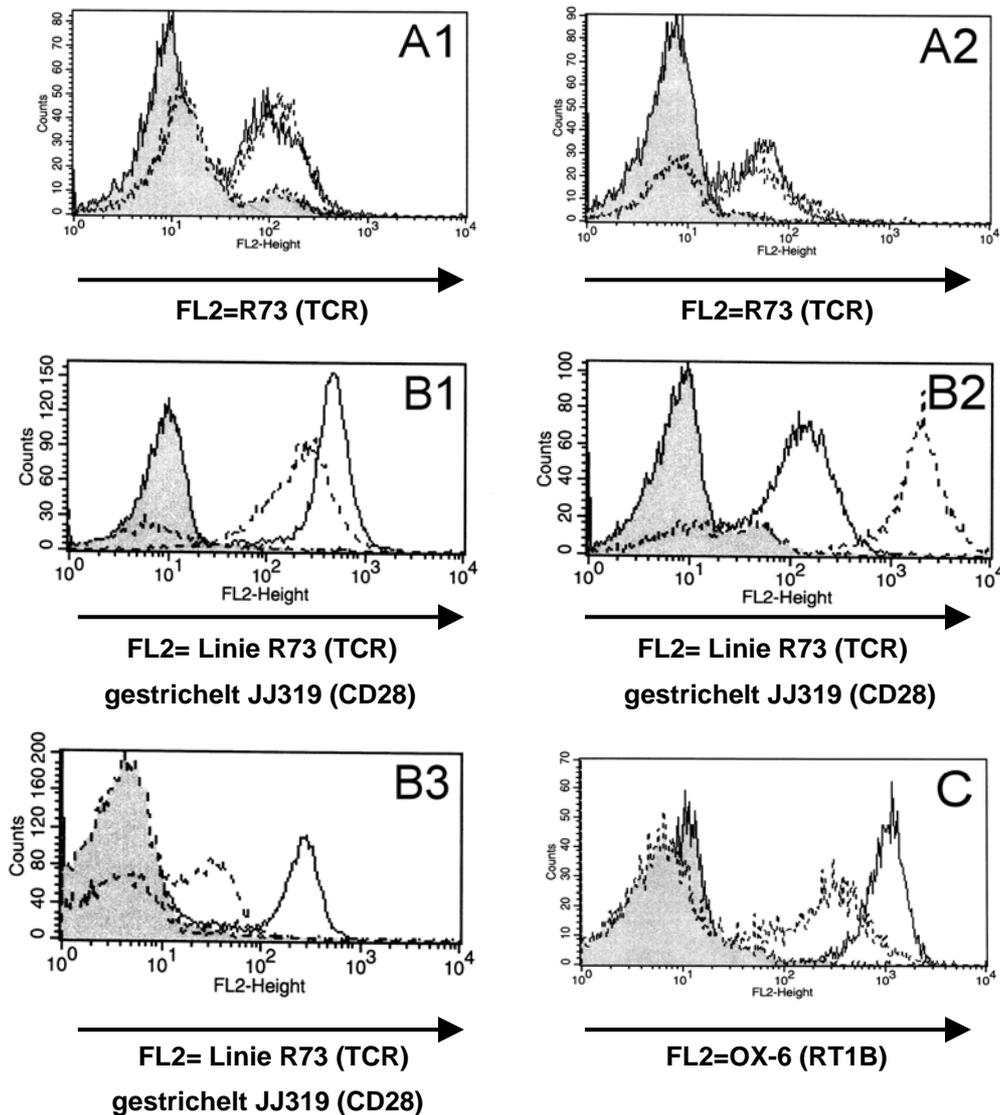


Abb. 25: Expression von TCR 35/1, Ratten CD28 und RT1B¹ in transgenen Zelllinien

- (A) Histogramme der Ratten TCR β -Ketten Expression gefärbt mit mAb R73 und D α MIg, auf TCR wildtyp (1, durchgehende Linie) und TCR Mutanten CDR2 (1, unterbrochene Linie), CDR4 (2, durchgehende Linie) und CDR2+4 (2, unterbrochene Linie) transduzierten 58C-CD28 Zellen im Vergleich mit dem T- Zellhybridom 53/4 und Milzzellen (siehe B).
- (B) Ratten CD28 (durchbrochene Linie) und TCR Expression (durchgehende Linie) auf 58C TCR Zellen (1), BW TCR CD28 transduzierten Zellen (2) und Milzzellen (3). Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte mit PE gekoppeltem mAb R73 und JJ319 und einer PE gekoppelten Isotypkontrolle (gefüllte Diagramme)
- (C) Histogramme von RT1B¹ transduzierten Raji Zellen (durchgehende Linie) und LEW Ratten Milzzellen (durchbrochene Linie) im Vergleich. Die Expression des MHC Moleküls wurde über direkte Immunfluoreszenzanalyse (FACS) mit dem RT1B¹ β spezifischen mAb OX-6-PE nachgewiesen. Unspezifische Bindungen wurden durch den isotypidentischen Kontrollantikörper V65-PE ausgeschlossen. Die gefüllten Diagramme zeigen die Isotypkontrolle.

Die MAS Antwort ging im Falle der CDR2+4 Mutationen komplett verloren, die Mutation in der CDR4 alleine hatte keine negativen Effekte. Die CDR2 Mutation hatte zu einem gewissen Maß einen negativen Effekt auf die Aktivierung durch MAS, welches von RT1B¹ positiven Zellen präsentiert wurde. Wurden Thymozyten als APC verwendet, wurden die Effekte der CDR2 Mutationen auf eine Aktivierung durch MAS ebenfalls beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu der manchmal verbesserten Antwort von 58CTCR Zellen auf MAS welche von RT1B¹ positiven Zellen präsentiert wurden (Abbildung 26).

Die Antwort YPM war für alle TCR sehr gut, was übereinstimmt mit den erhaltenen Daten von BV8S2A1 und BV8S4A2 exprimierenden, polyklonalen Zellpopulationen. Auch im Falle der YPM Antwort, war diese deutlich besser wenn RT1B¹ Raji Zellen in Gegensatz zu Rattenthymozyten als APC verwendet wurden. Dieses Ergebnis deutet auf eine bessere Bindung von YPM an humane MHC Klasse II als an Ratten MHC Klasse II Moleküle hin. Dies stimmt auch mit Ergebnissen der SEC1 Stimulationen überein, bei dem das Superantigen SEC1 besser von humanen APC präsentiert wird, als von Maus und Ratten APC.

Die Antwort auf eine Stimulation mit gpMBP ging nach einer Mutation der CDR2 und CDR2+4 gänzlich verloren (Abbildung 26).

Das generelle Bild des Beitrags der CDR2 und CDR4/HV4 zur Reaktivität der Antigen- und Superantigenerkennung des T-Zellrezeptors des Hybridoms 35/1 konnte in allen Experimenten nachgewiesen werden: Der Wildtyp TCR antwortete auf alle Liganden. Die CDR2 Mutante nur auf MAS und YPM, jedoch nicht auf gpMBP und SEC1. Die CDR4 Mutante antwortete auf gpMBP, MAS und YPM, jedoch nicht auf SEC1. Die CDR2+4 Mutante reagierte nur auf YPM, jedoch keinen anderen Liganden.

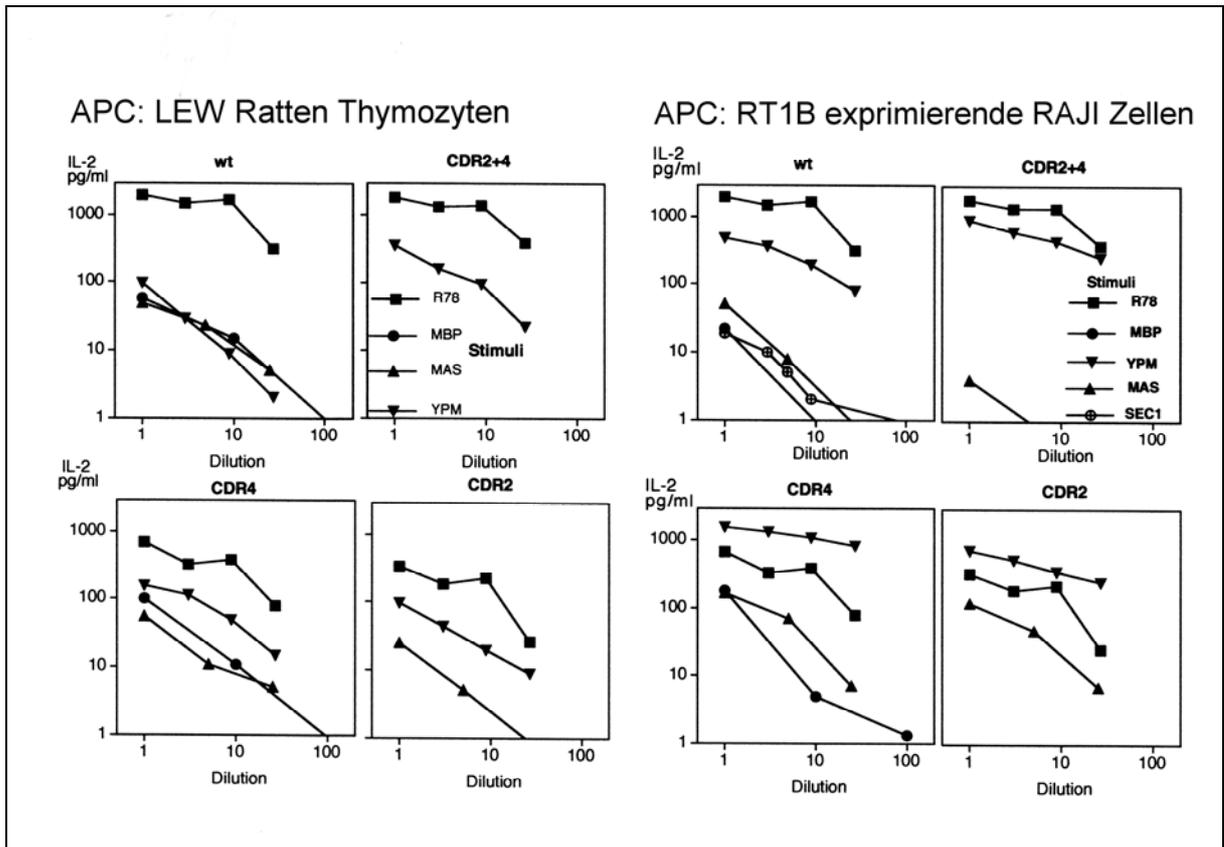


Abb. 26: Superantigen und MBP Antwort von 58C Zellen, welche mit wildtyp TCR oder CDR Mutanten transduziert wurden

Die verwendeten Stimuli sind in der Abbildung gezeigt. Als APC wurden 1×10^6 LEW Ratten Thymozyten /well (A) oder 5×10^5 Raji RT1B¹ Zellen / well eingesetzt. 1:1 Verdünnungen der jeweiligen Antigene entsprechen: YPM 10 μ g/ml, SEC1: 10 μ g/ml, gpMBP: 10 μ g/ml, MAS: 5ng/ml. mAb R73 wurde als 1:20 immobilisierter Kulturüberstand auf α MIg behandelten Flachbodenplatten eingesetzt.

4.7. Einsatz von RT1B¹ und CD28 exprimierenden Zelllinien zur Etablierung eines kalibrierten Zellsystems zur Untersuchung $\gamma\delta$ T-zell-aktivierender Substanzen

Humane $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen eine wichtige Brückenfunktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität einzunehmen. Sie zeigen eine spezielle Art der Antigenerkennung und besitzen Eigenschaften, die sich deutlich von denen der $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheiden. Um diese Eigenschaften umzusetzen, erkennen $\gamma\delta$ T-Zellen kleine, phosphorylierte nicht Peptid-liganden, wie Bisphosphonate oder Alkylamine und sind nicht klassisch MHC restringiert. Die Erkennung dieser Nichtpeptidliganden korreliert mit der Expression der $V\gamma_9$ und $V\delta_2$ Gensegmente und ist durch eine klonale T-Zellexpansion gekennzeichnet, welche keinen vorhergehenden Antigenkontakt benötigt.

Die Art der Ligandenpräsentation und in die Ligandenerkennung speziell involvierte Komoleküle bleiben bis heute ungeklärt, benötigen jedoch Zell-Zell Kontakt oder die Kostimulation von bei der Stimulation benachbarter Zellen (Allison et al., 2001). Ebenso unbeantwortet bleibt die Frage nach relevanten tumorassoziierten Liganden.

Hindernisse bei der Untersuchung der Ligandenspezifität primärer $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen oder von Klonen im humanen System sind z.B. deren häufige Expression von sogenannten KIRs (*killer inhibitory receptors*).

Dies sind Moleküle, die mit MHC Klasse I Molekülen auf den Zielzellen interagieren und die $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR vermittelte Aktivierung negativ modulieren. Sie sind an der Oberfläche von NK-Zellen, γ/δ T-Zellen und einer Subpopulation von α/β T-Zellen vorhanden.

Ein Maskieren der KIR oder MHC Moleküle zeigte eine TCR abhängige Erkennung von Liganden auf aktivierten T-Lymphozyten, die Effektorzelle selbst mit eingeschlossen. Zum anderen exprimieren γ/δ T-Zellen eine Reihe kostimulatorischer Moleküle (z.B. NKR-P1A, kp43 oder NKG2D), die eine Überprüfung der Beteiligung des TCR oder assoziierter Moleküle bei der Erkennung von Antigenen erheblich erschwert.

Alle Versuche mit den erwähnten Phospholiganden Maus oder Ratten γ/δ T-Zellen zu stimulieren, waren bis jetzt erfolglos oder führten zu schwer interpretierbaren Ergebnissen. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. 1. Mäuse und Ratten besitzen keine

γ/δ T-Zellrezeptoren mit entsprechenden Ligandenbindungseigenschaften. 2. Maus oder Rattenzellen können diesen Typ von Liganden nicht präsentieren. 3. Mäuse und Ratten besitzen weder Moleküle um Phospholiganden zu präsentieren noch die für Phospholiganden spezifischen γ/δ T-Zellrezeptoren.

Diese Überlegungen sind Grundlage für die Annahme, dass Mauszellen möglicherweise nicht in der Lage sind, Phospholiganden zu präsentieren. Ist das der Fall, so kann man diese Zellen nutzen, um durch Expression eines funktionellen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR an der Oberfläche dieser Zellen Hinweise auf mögliche akzessorische Moleküle oder die Bindungsstellen der Liganden zu erhalten. In bisherigen Versuchen wurde gezeigt, daß humane $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellrezeptoren allein zur Aktivierung humaner $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellklone ausreichen (Bukowski et al., 1995).

In den Untersuchungen sollte ein in seiner Ligandenspezifität charakterisierter $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR mittels retroviralen Gentransfers in ein T-Zellrezeptor negatives Maus T-Zellhybridom und eine T-Zellrezeptor negative humane Leukemie T-Zelllinie transferiert werden, um so definierte Indikatorzelllinien zu generieren, durch die eine Identifizierung von Tumor- und Infektionsassoziierten Antigenen möglich wäre. Dabei dienten mit dem hier untersuchten transgenen RT1B¹ Molekül transduzierte Zelllinien und mit transgenem $\alpha\beta$ TCR transduzierte Zelllinien im weiteren Verlauf der Experimente als Basis für ein definiertes System, um eine schlechtere Ligandenpräsentation der verwendeten APCs, welche auf spezifischen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien beruhen könnte, auszuschließen. Ebenso wurde durch Kotransduktion von humanem und Maus/Ratten CD28 (bzw. CD80) Molekülen der Einfluß kostimulatorischer Moleküle auf die Ligandenerkennung untersucht.

Anhand dieser Untersuchungen besteht die Möglichkeit durch den Einsatz unterschiedlicher Präsentatorlinien und definierter Mutationen die molekulare Basis der Erkennung von bakteriellen Antigenen beziehungsweise Tumorzellen durch $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen weiter zu charakterisieren.

4.7.1. Expression eines humanem $V\gamma_9/V\delta_2$ -TCR

Als Quelle zur Isolation der zellulären gesamten RNA diente der von PD Dr. Wilhelm aus der med. Poliklinik der Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellte humane $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellklon 8/3D5. Dieser Klon wurde von der AG Wilhelm generiert und in seiner Ligandenspezifität charakterisiert. Der Klon zeichnet sich durch eine starke Proliferation nach Stimulation mit spezifischem Antigen aus. Die Isolation der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Kit von Quiagen (3.2.4.) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Die in der Gesamt-RNA enthaltene Poly A (+)-RNA wurde anschließend durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) und mit Hilfe eines oligo dT-Primers in einzelsträngige (ss), komplementäre DNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde wie unter 3.2.6.2. näher ausgeführt weiterbehandelt.

Über PCR wurden die $V\gamma_9/V\delta_2$ Ketten amplifiziert und die Sequenzen des humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ -Klones 8/3D5 für die γ - und δ -Kette ermittelt. Danach wurden die γ - und δ -Kette in den retroviralen Vektor SFG-S65T kloniert (siehe Diplomarbeit Matthias Kreiß).

4.7.2. Expression des humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR auf der Zelloberfläche TCR -/- Mausezellen (BW58C)

Die neu generierten Klone wurden mittels retroviralem Gentransfers in ein T-Zellrezeptor negatives Maus T-Zellhybridom (BW58C) transferiert (siehe 2.7.). Die Gentransduktion wurde wie in 3.2.10 beschrieben mittels eines MoMLV basierenden retroviralen Vektorsystem durchgeführt (Pear et al., 1993).

Da der transduzierte humane T-Zellrezeptor nur in Verbindung mit dem endogen vorliegenden CD3-Molekül an der Oberfläche exprimiert wird, wurde mit mAk zum einen auf CD3-Expression zum anderen auf γ/δ -Expression getestet (siehe 2.4.). Abbildung 27 zeigt die Expression des humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR auf der Zelloberfläche der gezeigten BW Zelllinie. Mit den unter 3.2.10. beschriebenen Bedingungen zeigten über 80% der mit SFG-S65T transduzierten Zellen eine CD3 Oberflächenexpression. Die Anzahl $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR positiver Zellen sollte ähnlich sein, jedoch war dies hier über Fluoreszenzmessung schwer zu ermitteln, da der

verwendete Antikörper eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität hatte. Als Kontrollen dienten dabei die entsprechenden isotypidentischen Kontrollantikörper. Die so transduzierten Zellen wurden anschließend subkloniert und auf eine hohe IL-2 Produktion nach Stimulation selektioniert.

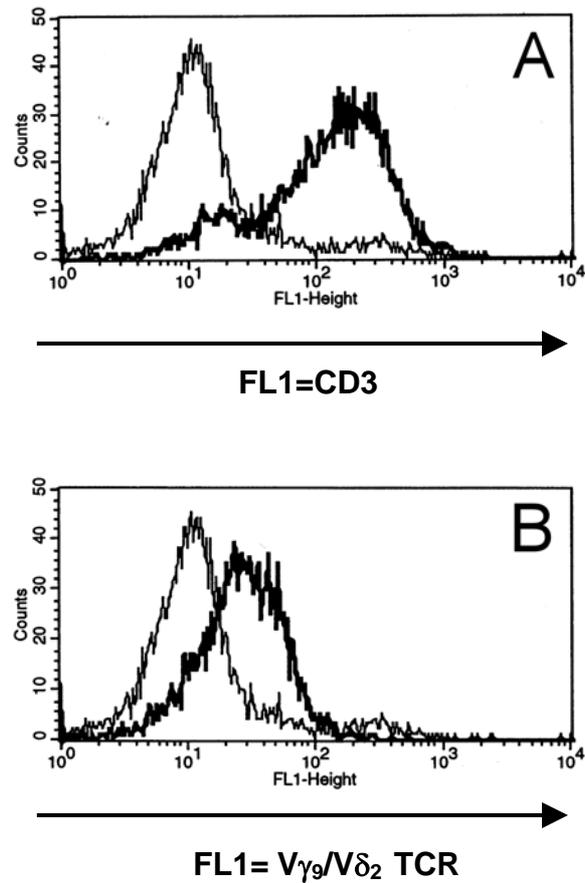


Abb. 27: Expression von CD3 und γ/δ TCR in mit TCR γ und TCR δ transduzierten BW58 Zellen

Histogramm der Expression nach Färbung mit mAk anti-Maus CD3-FITC.(1:100),(A); und anti-human- γ/δ -FITC (1:100),(B). Positive Zellen sind als feine Linie, die mit isotypidentischen Kontrollantikörpern (1:100) gefärbten Zellen sind als Schwarze Linie gezeigt.

4.7.3. Die Erkennung von Liganden des mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR transduzierten Maus T- Zellhybridoms (BW58C) ist CD28 abhängig

Um die Stimulationsfähigkeit und den Einfluß des CD28 Moleküls auf die Erkennung von Nichtpeptidliganden der mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR transduzierten Zellen zu überprüfen, wurden 5×10^4 BW $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und 5×10^4 $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und CD28 exprimierende Zellen mit jeweils 5×10^4 Rajizellen mit und ohne $0.01 \mu\text{M}$ Phospholigand HPPBr (Stammlösung 1mM HPPBr) für 48h in 96well Platten inkubiert und anschließend der IL-2 Gehalt des Kulturüberstands mit Hilfe des OptEIA-Kits gemessen. Dabei konnte bei den CD28-/- Transduktanten sogar in Anwesenheit des Antigens und Rajizellen keine IL-2 Produktion nachgewiesen werden. Jedoch zeigten CD28 exprimierende Transduktanten eine starke IL-2 Antwort nach Stimulation mit Antigen in Gegenwart von Rajizellen (siehe Abbildung 28).

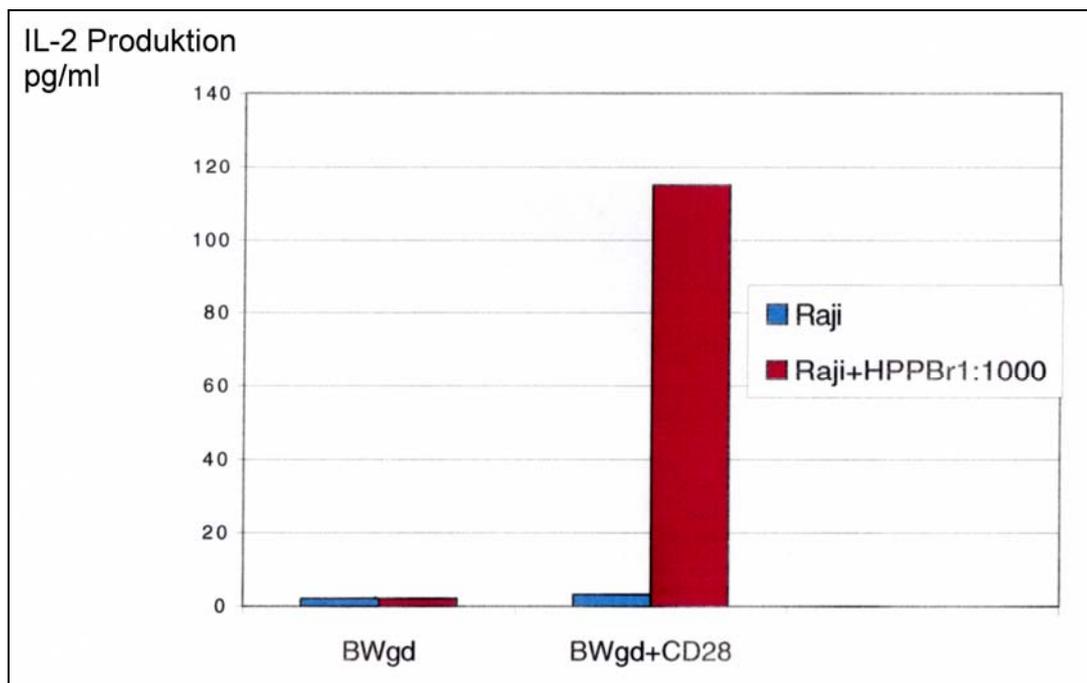


Abb. 28: Analyse der CD28-Abhängigkeit der mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR transduzierten BW58C Zellen nach HPPBr Stimulation (Verdünnung 1:1000 entspricht $0,01 \mu\text{M}$).

4.7.4. Das mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und Maus /Ratten CD28 transduzierte Maus T-Zellhybridom (BW58C) sezerniert nach Zoledronat Stimulation IL-2 nur in Gegenwart humaner B-Zellen

Abbildung 29 zeigt die IL-2 Expression eines hoch exprimierenden Klons des mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und Maus/Ratten CD28 transduzierten Maus T-Zellhybridoms (BW58C) nach Stimulation (5×10^4 Zellen) mit dem synthetischen Bishosphonat Zoledronat. Dabei konnte ebenfalls eine klare konzentrationsabhängige Induktion von IL-2 nachgewiesen werden. Die nachgewiesene Induktion von IL-2 war dabei jedoch abhängig von der Gegenwart humaner (Raji) antigenpräsentierender Zellen, aber nicht von murinen Mastocytomzellen (P815/P80) und murinen B-Zellen (M12.C3, nicht gezeigt). Ebenfalls konnte bei Verwendung von $\alpha\beta$ TCR transduzierten CD28 positiven BW58 Zellen, als auch bei Maus bzw. Ratten ConA und LPS Blasten keine IL-2 Induktion nachgewiesen werden.

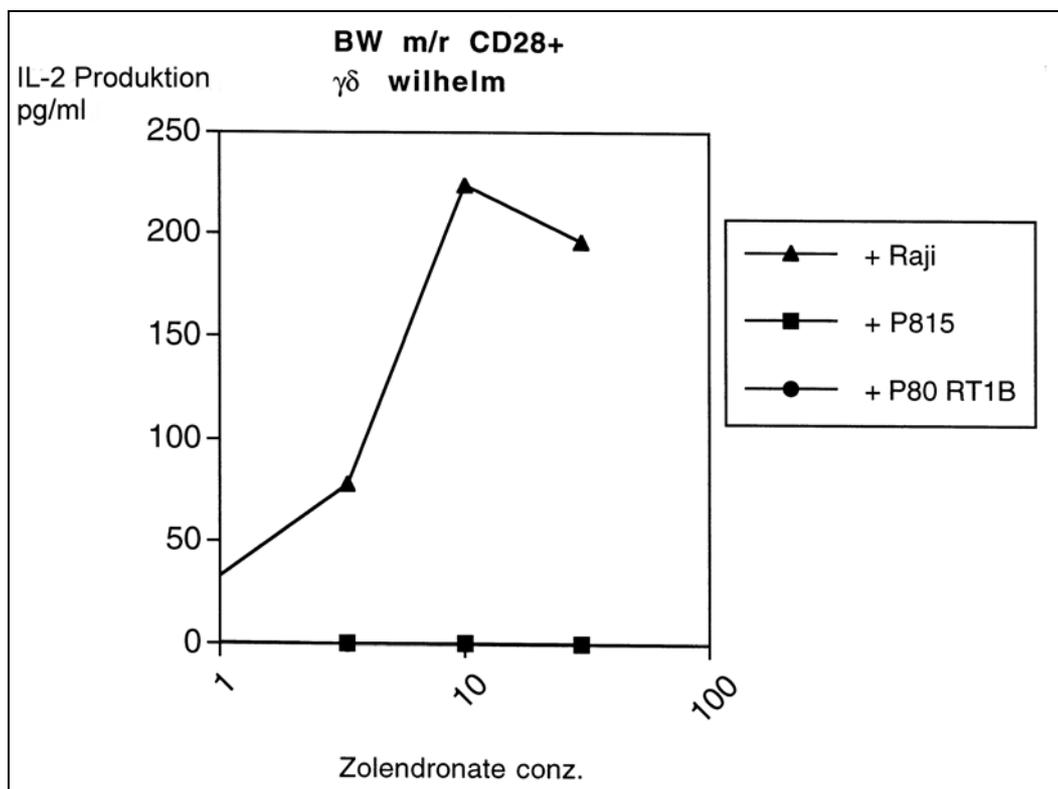


Abb. 29: Analyse der Zoledronat induzierten IL-2 Expression und Raji-Abhängigkeit der mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und mit Maus/Ratten CD28 transduzierten BW58C Zellen nach Zoledronat Stimulation (in $\mu\text{g/ml}$).

4.7.5. Generierung eines „kalibrierten“ Systems zur Analyse der Antigenpräsentation humaner $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellrezeptoren

Um generelle qualitative Unterschiede z.B. durch die Transduktion oder das endogen schlechtere Verhalten in den antigenpräsentierenden und antigenerkennenden Eigenschaften der verwendeten APCs und mit humanem $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR transduzierten BW58 auszuschließen, werden zur Kontrolle der antigenerkennenden Eigenschaften mit dem $\alpha\beta$ TCR des 35/1 Hybridoms und CD28 transduzierte BW58 Zellen eingesetzt und zur Kontrolle der antigenpräsentierenden Eigenschaften MHC Klasse II (+MBP) und CD80 transduzierte APCs eingesetzt.

Über die Einführung von MHC oder kostimulatorischen Molekülen wie CD28 und CD80 liegen nun zwei gleich gut charakterisierte und sehr ähnlich reagierende transduzierte TCR Systeme vor: Zum einen $\alpha\beta$ TCR transduzierte Zelllinien, mit RT1B¹ transduzierten korrespondierenden APC-Linien, zum anderen $\gamma\delta$ TCR transduzierte BW Zellen.

Somit konnte die Basis für ein heterologes System, zur Beschreibung der $V\gamma_9/V\delta_2$ Ligandenerkennung und Ligandenpräsentation, gelegt werden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion des Ratten MHC Klasse II Moleküles RT1B¹ und des von ihm präsentierten Autoantigens basisches Myelinprotein (MBP) mit autoreaktiven TCR charakterisiert werden. Von besonderem Interesse war dabei die Interaktion mit dem TCR 35/1, der typisch für TCR ist, die in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) der LEW Ratte vermehrt zu finden sind. Zu diesem Zweck wurde versucht, lösliche MHC Klasse II -artige Moleküle herzustellen und ihre Peptid- und TCR-Bindung bestimmt. Weiterhin wurden MHC Klasse II Konstrukte, die mit einem antigenen Peptid kovalent verbunden sind, generiert, in verschiedenen Zellen exprimiert und ihre T-zellstimulatorische bzw. immunmodulatorische Kapazität *in vitro* und *in vivo* getestet und mit einer RT1B¹ Mutante verglichen. Ebenfalls wurde im Rahmen einer Kooperation begonnen, RT1B¹-Tetramere zu generieren.

Um Aufschluß über die relevanten Bereiche der Erkennung diverser Superantigene des TCR zu erhalten, wurde der TCR 35/1, sowie TCR mit mutierten CDR der TCR- β -Kette in Ratten CD28 positiven T-Zelllinien exprimiert und in der Aktivierung durch unterschiedliche Liganden verglichen.

Hierzu wurde das in der EAE der Lewisratte präferentiell exprimierte T-Zellrezeptorgen BV8S2 (V β 8.2) im Vergleich mit dem hoch homologen BV8S4 Gensegment in bezug auf Antigen- und Superantigenreaktivität verglichen.

Schließlich wurde getestet, inwieweit die Expression von CD28 die für die Aktivierung von $\gamma\delta$ TCR transduzierten T-Zelllinien durch $\gamma\delta$ TCR Liganden essentiell ist.

Durch die Untersuchungen der Aktivierung und Spezifität humaner $\gamma\delta$ T-Zellen sollte ein definiertes TCR-Expressionsystem aus Zelllinien generiert werden, anhand dessen weitergehende Informationen über die Antigenerkennung der V γ 9V δ 2 T-Zellen, sowie deren Aktivierung und die Präsentation von V γ 9V δ 2 T-Zelliganden gewonnen werden sollten.

5.1. Expression von RT1B¹ und Charakterisierung der Funktionalität

Zuerst wurde die α und β -Kette von RT1B¹ aus Lewisratten cDNA kloniert und sequenziert. Die ermittelte und verwendete RT1B¹ β -Kette war dabei mit der bereits publizierten Sequenz identisch (Syha-Jedelhauser et al., 1991), die ermittelte RT1B¹ α -Kette zeigte jedoch, wie vorher bereits erwähnt, sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Aminosäureebene Unterschiede zur bereits publizierten Sequenz auf (siehe Abbildung 26).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte korrekte Sequenz der RT1B¹ α -Kette kann zukünftig in verschiedenen Studien von RT1 restringierten Autoimmunerkrankungen (LEW, F344 oder WKY) von Nutzen sein. Dies gilt ebenso für die in der Arbeit generierten Expressionsvektoren und transgenen Zelllinien.

Die so erhaltenen und sequenzierten RT1B¹ Ketten wurden in verschiedene Zelllinien, wie humane B-Zelllymphomzellen oder murine Mastozytomzellen, retroviral transduziert. Dabei zeigte sich durchweg eine hohe Transduktionsrate von über 80%. Diese neu generierten Zelllinien wurden anschließend auf ihre Funktionalität getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zelllinien M12C3, P80 und BW58C, welche mit Ratten Klasse II Genen transduziert wurden, in der Lage sind, spezifischen T-Zellen funktionell und restringiert Antigen zu präsentieren. Dabei genügt die Transduktion der MHC Klasse II Komplexes in die gezeigten Zielzellen, um antigenspezifische Ratten T-Zellen zu aktivieren.

Als möglicher zukünftiger experimenteller Ansatzpunkt könnte über fortführende Mutagenesestudien mit Hilfe dieser Transduktanten weitere Erkenntnisse im Hinblick auf die molekulare Basis der Immunrestriktion und der spezifischen Erkennung, welche zur Aktivierung von autoreaktiven Ratten T-Zellen führt, gewonnen werden. Hierbei könnten gezielt definierte Bereiche des MHC Moleküls verändert werden und in Stimulationsexperimenten auf ihre Fähigkeit Antigen zu präsentieren, getestet werden.

Über weitere Mutagenesestudien lässt sich mit Hilfe dieser Transduktanten die molekulare Basis der Immunrestriktion und der spezifischen Erkennung, welche zur Aktivierung von autoreaktiven Ratten T-Zellen führt, besser charakterisieren.

Einige, der so generierten künstlichen antigenpräsentierenden Zelllinien fanden im Verlauf der folgenden Experimente weitere Anwendungen.

5.2. Untersuchungen einer neuen RT1B¹ α -Ketten Variante (V38M) hinsichtlich Oberflächenexpression und Funktionalität

Bei der Klonierung, Expression und funktionellen Charakterisierung des wildtypischen RT1B¹ wurde ebenfalls ein mutiertes RT1B¹ Molekül, für dessen Generierung ein Plasmid mit einem α -Kettengen von Prof. Reske von der Universität Mainz zur Verfügung gestellt wurde, exprimiert. Dieses Molekül enthielt ein α -Kette, die einen Aminosäureaustausch (V=>M) an Position 38 in der α 1 Domäne aufwies.

Interessanterweise zeigte eine Genbank-Sequenzanalyse, dass die Position V38 in über 400 Säugetier MHC Klasse II Molekülen identisch und somit hochkonserviert ist. Ausnahmen hiervon waren grundsätzlich keine Restriktionselemente, wie z.B. DM oder DQ homologe Moleküle. Eine Ausnahme war eine Primatensequenz (V38M). Eine modellhafte Untersuchung der Molekülstruktur und der Positionierung von V38M im MHC Klasse II Molekül zeigte, dass der im Vergleich zu Valin längere schwefelhaltige Kohlenwasserstoffrest im Methionin sich sterisch ungünstig auf die Antigenbindung auswirken könnte, was zu einem Verlust der Antigenbindung bzw. Präsentation führen könnte. Anhand von Oberflächenexpression und anschließenden funktionellen Tests wurde diese Hypothese überprüft.

Wurde diese α -Ketten Mutante von RT1B¹ mit der nativen β -Kette parallel in verschiedene Zelllinien transduziert, so zeigte sich bei der M12.C3 Zelllinie (H2A negative B-Zell-lymphomlinie) eine Oberflächenexpression, die ungefähr dem Niveau der Wildtyp Expression entsprach. Im Falle der P80 Zelllinie erreichte die Oberflächenexpression zwar ebenfalls fast die Stärke der Wildtyp Expression, jedoch wurde beobachtet, dass die Oberflächenexpression stark schwankte und sicherlich mit den verwendeten P80 Zellen im Zusammenhang steht, die im Gegensatz zu den verwendeten M12.C3 Zellen sehr unterschiedliche Oberflächenexpressionen nach der Transduktion zeigten.

In funktionellen Tests konnte interessanterweise gezeigt werden, dass M12.C3 Zellen kotransduziert mit der nativen β -Kette und der Variante der α -Kette (V38M) trotz guter Oberflächenexpression das MBP Peptid dem T-Zellhybridom 35/1 wesentlich schlechter präsentieren können, dabei sei darauf hingewiesen, dass M12.C3 Zellen eine endogene MHC

α -Kette besitzen, die allein durch Einbringung der RT1B¹ β -Kette in der Lage sind, RT1B¹ exprimieren, was zu der beobachteten Oberflächenexpression führen könnte. Um dies zu überprüfen, müsste man den Anteil an endogen exprimierter α -Kette definieren können. Dies wäre über Antikörper möglich, welche speziell I-A^d Genprodukte erkennen können. Nach retroviralem Transfer der RT1B¹ β -Kette könnte durch Immunfluoreszenzanalyse der Anteil RT1B¹ beziehungsweise I-A^d gebundenen spezifischen Antikörper, nachgewiesen werden.

Ideal wäre eine Markierungsmöglichkeit der mutierten α -Kette. Ein konformationsabhängiger Antikörper, der die mutierte α -Kette nicht mehr erkennt, könnte dazu eingesetzt werden. Anschließend könnte durch Vergleich der Bindungsqualität der beiden Antikörper (Erkennung wildtyp/mutierte α -Kette) ein Rückschluss auf die Expressionsstärke der beiden α -Ketten gezogen werden.

Durch kovalentes Binden von MBP an die RT1B¹ β -Kette, sollte überprüft werden, inwieweit die Funktionalität der RT1B¹ α V38M Variante durch ein künstliches Forcieren der Antigenbindung in der MHC Grube wiederhergestellt werden kann. Hierzu wurde über ein 10aa großes Peptidverbindungsstück das MBP₇₁₋₉₀ Peptid kovalent mit dem N-Terminus der β -Kette verbunden, wobei der C-Terminus des MBP₇₁₋₉₀ Peptids über eine singuläre NheI-Schnittstelle an den N-Terminus des Verbindungsstücks angefügt wurde.

Nach retroviraler Transduktion von RT1B¹ zeigten sich bei der M12.C3 Zelllinie nur leichte Unterschiede in der Oberflächenexpression in Abhängigkeit der mit der V38M Variante der RT1B¹ α -Kette kotransduzierten β -Ketten (mit/ohne kovalentes MBP₇₁₋₉₀ Peptid). Jedoch zeigte die durch die Substitution V38M der RT1B¹ α -Kette in der P80 Zelllinie teilweise signifikante Erniedrigung in der Oberflächenexpression nach Transduktion von RT1B¹ β MBP₇₁₋₉₀ eine Verbesserung auf wt Niveau. Generell zeigten sich die Expressionen der beiden RT1B¹ α -Ketten (wt/Mutante) durch die Koexpression mit RT1B¹ β MBP₇₁₋₉₀ verbessert und übertrafen teilweise sogar das Niveau der RT1B¹ Wildtyp Expression. Durch den flexiblen Aminosäurelinker scheint das Peptid förmlich in die Antigenbindungsgrube gezwungen zu werden und somit können auch gewisse sterische Hinderungen, welche zum Verlust der Funktionalität führen, überwunden werden. Mehrere Veröffentlichungen beschreiben die verbesserte Bindung zwischen Antigen und MHC Bindungsgrube durch kovalentes Binden

des Peptids an eine der MHC Klasse Ketten. Dabei wurden verschiedenste Verbindungsstücke in bezug auf Länge und Aminosäuresequenz detailliert beschrieben (Burrows et al., 1990).

Die daraufhin ermittelten Stimulationsdaten belegen, dass die RT1B¹ V38M Variante mit kovalentem MBP₇₁₋₉₀ funktionell in der Lage ist, die attenuierte Funktionalität der V38M Mutante wiederherzustellen und das Hybridom 35/1 effektiv zu stimulieren. Diese Wiederherstellung der Funktionalität der V38M Mutante durch direktes Verbinden des Antigens an die β -Kette von RT1B¹ lässt eher einen Effekt der V38M Mutation im Bereich der direkten Antigenbindung oder an der RT1B¹ Gesamtkonformation vermuten, als eine direkte Interferenz der TCR Bindung. Diese Vermutung wird durch die Lage der Aminosäure 38 der RT1B¹ α -Kette am Ende des β -Faltblattes 3 der $\alpha 1$ Domäne gestärkt. Weniger klar ist der Einfluß der auf die direkte Peptidbindung. Jedoch könnte der im Vergleich zum Valin längere schwefelhaltige Kohlenwasserstoffrest im Methionin sich sterisch ungünstig auf die Antigenbindung auswirken, da diese Aminosäuren direkt Richtung Antigen zeigen.

Nachdem gezeigt wurde, dass die kovalente Bindung des Antigenpeptides, bestimmte, noch zu klärende Defekte der Antigenpräsentation korrigieren kann, sollte überprüft werden, inwieweit Zelllinien, die RT1B¹ Moleküle mit kovalent verbundenen Peptidkomplexen exprimieren, im vorliegenden Fall also RT1B¹ MBP₇₁₋₉₀ Komplexe, künftig therapeutisch Anwendung finden könnten.

5.3. Effekte von RT1B¹ exprimierenden murinen Mastrozytomazellen in der aktiven und AT-EAE

Neuere therapeutische Ansätze zur Prävention und Behandlung von Autoimmunerkrankungen zielen besonders auf die gezielte Suppression autoreaktiver T-Zellen ab. Dies kann über eine Immunmodulation am trimolekularen TCR/MHC/Peptid-Komplex erreicht werden, was zu einer sogenannten „Hochzonen-Toleranz“ führen kann (Suzuki et al., 1988). Diese wird z.B. durch die Induktion von Anergie oder die apoptotische Eliminierung von T-Zellen, wie sie während eines natürlichen Krankheitsverlaufs erfolgt, erreicht.

Ebenfalls über immunologische Effekte wie Anergie oder Apoptose sollten MBP spezifische autoreaktive T-Zellen im Verlauf einer autoimmunen experimentellen Enzephalomyelitis nach Behandlung mit RT1B¹ transduzierten Mausmastozytomzellen supprimiert werden.

Für die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurde das P80-System eingesetzt. Dazu wurden die Gene des MHC-Klasse II Molekül RT1B¹, retroviral transferiert und die so generierten transgenen Zellen mit dem enzephalitogenem Peptidpitop von MBP beladen (auch kovalent gebunden, siehe oben). Daraufhin wurden die möglichen therapeutischen Effekte dieser Zellen im klinischen Verlauf der EAE, nach adoptivem Transfer, charakterisiert und analysiert. Diese Versuche wurden gemeinsam mit Dr. A. Weishaupt und Prof. R. Gold von der neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg durchgeführt.

Native und mit RT1B¹ transduzierte P80 Zellen wurden im Tiermodell zur Behandlung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) eingesetzt, um einen therapeutischen Effekt der Zellen im Krankheitsverlauf, in Bezug auf Dauer und Schwere, zu untersuchen.

Zuerst wurde die T-Zellerkennung der CD80 positiven P80 Zellen ohne und mit zusätzlichem RT1B¹ anhand der Proliferationsantwort untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proliferation MBP spezifischer T-Zellen nur bei Expression von RT1B¹ und CD80 erfolgt. Die hier erzielten Proliferationsantworten waren sogar höher, als die der zur Kontrolle eingesetzten und mit exogenem MBP stimulierten Thymozyten. Nachdem die Funktionalität der so transduzierten Zellen gezeigt wurde, wurde ein möglicher Effekt der MHC Klasse II positiven, CD80 positiven P80 Zellen auf den Krankheitsverlauf einer durch adoptiven Transfer ausgelösten (AT) EAE untersucht. Es erhielten jeweils 6 Versuchstiere eine einmalige Injektion von 2.5×10^5 oder 10^6 P80-RT1B¹ bzw. P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen und eben so viele Kontrollzellen am Tag 2 der beginnenden EAE in die Schwanzvene, nach dem Transfer von drei Tagen zuvor stimulierten MBP13 T-Zellen. Eine Gruppe von Kontrolltieren erhielt als Injektion nur PBS.

AT-EAE Ratten, die nur eine PBS Injektion erhielten entwickelten schwere Symptome der Krankheit, wobei das Maximum an Tag 4 bzw. 5 anhand von Paraplegie oder Tetraparese vorlag. Versuchstiere, die mit 2.5×10^5 bzw. 10^6 P80-RT1B¹ Zellen behandelt wurden, zeigten

einen ähnlichen Krankheitsverlauf. Die Verabreichung gleicher Dosen P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen führte jedoch zu einem signifikanten benignen Effekt auf den Krankheitsverlauf der AT-EAE verglichen mit den Kontrolltieren. Dies korreliert auch mit den vorher gezeigten Stimulationsdaten, bei denen gezeigt werden konnte, dass sich kovalent an die RT1B¹ β -Kette gebundenes MBP funktionell in die MHC Klasse II Antigenbindungsgrube legt und zu einer starken Proliferationsantwort führt. Um zu überprüfen, ob der bessere klinische Verlauf der Erkrankung nach Verabreichung der P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen auf eine höhere Apoptoserate der im Rückenmark befindlichen MBP spezifischen T-Zellen zurückzuführen ist, wurde in weiterführenden Versuchen die zelluläre Infiltration und die Apoptoserate der AT-EAE Tiere nach dem Experiment untersucht. Nach einer Einzelinjektion von 10⁶ P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen am Tag 2 nach Transfer ergab die histologische Untersuchung des Rückenmarks am Tag 6 einen sofortigen Rückgang der T-Zellinflammation und eine signifikante Zunahme des Prozentsatzes der apoptotischen T-Zellen verglichen mit der PBS Kontrollgruppe. Wurden 10⁶ P80-RT1B¹ Zellen injiziert, zeigte sich keine deutliche Zunahme der T-Zellapoptose im Vergleich mit den PBS behandelten Kontroll EAE Tieren (persönliche Mitteilung von Dr. Weishaupt). Ein zu beachtender, wichtiger Aspekt der histologischen Untersuchung ist dabei der Zeitpunkt der Zellanalyse, da injizierte, aktivierte T-Zellen erst nach einigen Tagen in das ZNS migrieren.

In weiteren vorläufigen, nicht in dieser Arbeit gezeigten Experimenten wurden auch die klinischen Effekte während der Behandlung einer aktiven EAE mit CD80 positiven P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen analysiert. Dazu erhielten jeweils 6 Versuchstiere eine Einzelinjektion von 10⁶ Zellen am Tag 8 und Tag 12 in die Schwanzvene nach Inokulation mit 75 μ g (100 μ l) enzephalitogenem MBP₆₈₋₈₈ Peptid in CFA(2mg/ml). Die Kontrolltiere wurden lediglich mit PBS injiziert. Lewisratten, die nur PBS injiziert bekamen, zeigten den typischen Krankheitsverlauf einer aktiven EAE. Wobei das Krankheitsmaximum am Tag 14 nach Inokulation in Form von Paraplegie und Tetraparese erreicht wurde. Ähnlich, wie bei der zuvor beschriebenen AT-EAE ergab die Verabreichung von 10⁶ CD80 positiven P80-RT1B¹-MBP₇₁₋₉₀ Zellen eine signifikante Verbesserung des Krankheitsverlaufs im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies könnte ebenfalls auf Apoptose der autoreaktiven T-Zellen hinweisen. Zur genaueren Überprüfung, muss die TCR Oberflächenexpression der T-Zellen analysiert

werden, wobei eine Herunterregulierung ein deutliches Zeichen für beginnende apoptotische T-Zellen wäre. Weiterhin können auch andere Formen der Toleranzinduktion, wie die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen, nicht ausgeschlossen werden.

Interessant ist die Beobachtung, dass P80-RT1B¹ auch ohne exogen verabreichtes MBP zu einer erkennbaren Erniedrigung der aktiven EAE führte, besonders nach der zweiten Verabreichung der Zellen am Tag 12 nach Beginn der EAE. Dieser Effekt könnte auf endogen freigesetztes MBP zurückgeführt werden.

Autoimmune, entzündliche Erkrankungen verursachen eine nicht geringe Morbidität und Mortalität. Bei der Behandlung der Autoimmunerkrankungen steht dabei das Verständnis und die Kontrolle von immunologischen Aspekten und Reaktionen im Vordergrund. In den hier gezeigten Ergebnissen wird die biologische Effizienz der eingesetzten transgenen Tumorzelllinien charakterisiert. Erste klinische Studien zur Behandlung humaner Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose (Weiner et al., 1993) oder Diabetes (Barnett et al., 1998), lassen zwar die orale Toleranz als wirkungsvolle Therapie erscheinen, welche spezifisch die Immunantwort von B- und T-Zellen gegen Autoantigene moduliert, ohne die Integrität des Immunsystems zu beeinflussen (Thurau et al., 1997), jedoch wäre der Einsatz transgener Tumorzellen auch ein möglicher Ansatzpunkt zur gezielten Deletion oder Anergisierung autoreaktiver T-Zellen.

5.4. Generierung neuartiger RT1B¹ „Singlechain“ Konstrukte

Da TCR/MHC/Peptid Interaktionen die Basis der spezifischen Immunantwort definieren, ist ein Verständnis der strukturellen Elemente und funktionellen Grundlagen dieser Erkennung von großer Bedeutung. Die TCR Erkennung spezifischer MHC/Peptid Komplexe erfolgt durch die Bindung der CDRs mit den variablen V-Regionen der α und β Ketten. Neuerdings gewinnen zur Charakterisierung dieser Bindung besonders rekombinante, lösliche Moleküle an Bedeutung.

Als alternativer Ansatz zur Charakterisierung der MHC/TCR Interaktion und zur Erkennung und Modulation RT1B¹ spezifischer T-Zellen, wurden deshalb zusätzlich zu den in dieser Arbeit beschriebenen RT1B¹ transduzierten Zelllinien zellgebundene RT1B¹ Singlechain-Moleküle generiert. Von Interesse waren dabei sowohl die Eigenschaften dieser Moleküle in bezug auf Expressionsfähigkeit und Funktionalität, als auch im Vergleich zueinander.

Basierend auf der Tatsache, dass die beiden extrazellulären Domänen von MHC Klasse II Molekülen genügen, um gebundenes Peptid dem TCR-CD4 Komplex zu präsentieren und dieses $\beta 1\alpha 1$ RT1B¹ Konstrukt in der Lage war, nach Antigenbeladung sowohl aktive, als auch passive EAE Erkrankungen *in vivo* und *in vitro* durch selektive Inhibierung der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen, zu verbessern, (Wettstein et al., 1991 und Burrows et al., 1997), wurde ein Singlechain Molekül als potentielles Detektionsmittel autoreaktiver T-Zellen generiert, bei dem an den C-Terminus der $\beta 1$ Domäne direkt die komplette reife α -Kette angefügt. Um das Singlechain Konstrukt zu vervollständigen, wurde hier ebenfalls das MBP-Peptid über ein 11aa großes Peptidbindungsstück kovalent an den N-Terminus der RT1B¹ β -Kette angefügt.

Weiterhin wurde ausgehend von der Publikation von Rhode et al. 1996, in der gezeigt wurde, dass ein murines IA^d Singlechain Molekül, welches die komplette extrazelluläre β - und α -Ketten mit einem langen Aminosäurelinker verbindet, effektiv T-Zellantworten stimulieren, Zytokine freisetzen und Apoptose verursachen kann, ein zweites RT1B¹ Singlechain Molekül generiert. Dadurch sollte das existierende murine IA^d Modell auch im Rattensystem etabliert werden und ebenfalls der Einfluss des transgenen RT1B¹ Singlechain Moleküls auf die T-Zellstimulation untersucht werden.

Diese Moleküle sollten dann auf ihre mögliche Oberflächenexpression, sowie die stimulatorischen bzw. inhibitorischen Eigenschaften untersucht werden.

Dabei konnte bis zum Zeitpunkt der Untersuchung über Immunfluoreszenz keine Bindung des für die β -Kette von RT1B¹ spezifischen mAb OX-6 und somit keine Oberflächenexpression festgestellt werden. Allerdings konnte im Fall des ersten erwähnten getesteten Singlechain Moleküls eine intrazelluläre Bindung des spezifischen Antikörpers OX-6 nachgewiesen werden.

Durch unseren Kooperationspartner in Utrecht wurde ein so genannter MHC-Peptid Assay (Wauben et al., 1997 und Joosten et al., 1994) mit dem von uns hergestellten Material durchgeführt, da diese Gruppe große Erfahrung auf dem Gebiet löslicher MHC Moleküle besitzt. Anhand dieses Tests kann eine spezifische Bindung eines MHC Klasse II Moleküls mit einem Antigen und, als weiterführender Test, die Inhibierung dieser Bindung über Immunblot nachgewiesen werden. In dem für unser Labor durchgeführten Bindungsnachweis wurden verschiedene Konzentrationen des gereinigten rekombinanten $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts in verschiedenen molaren Verhältnissen biotinyliertem Peptid MBP₇₂₋₈₅ gemischt. Dies erfolgte in Gegenwart eines Protease Inhibitor Cocktails (Joosten et al., 1994).

Es konnte eine deutlich erkennbare, konzentrationsabhängige Bindung eines biotinylierten MBP₆₈₋₈₈ an das rekombinante $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukt nachgewiesen werden. Dabei war sowohl eine Konzentrationsabhängigkeit des $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts, als auch des Peptids zu erkennen. Die Bindung von biotinyliertem MBP₆₈₋₈₈ an das $\alpha 1\beta 1$ -Domänen Konstrukts war auch peptidspezifisch (nicht gezeigte Daten).

Dies könnte den zukünftigen Einsatz des rekombinanten $\beta 1\alpha 1$ -Domänen Konstrukts in weitergehenden Funktionalitätstest erlauben, um den Einfluß auf die T-Zellaktivierung in Bezug auf inhibitorische Aktivität, und die Erkennung und Regulation potentiell auto-pathogener T-Zellen zu untersuchen.

Wieso jedoch das dem IA^d sehr ähnliche RT1B¹ Singlechain Molekül, bei gleicher Anordnung der Gene, nicht exprimiert wurde lässt Spielraum für Spekulationen. Die Sequenzen beider Moleküle sind sehr ähnlich, was eine Konstruktion und experimentelle Überprüfung der Exprimierbarkeit und Funktionalität begründet. Zuerst muss die Frage geklärt werden, ob überhaupt eine RNA-Synthese erfolgt. Dies kann in weiteren Experimenten über den Nachweis der Proteinsynthese oder über eine intrazelluläre Bindung des OX-6 Antikörpers nachgewiesen werden. Als nächster Schritt sollte die Oberflächenexpression, ebenfalls über eine OX-6 Bindung, überprüft werden.

Sollte lediglich die Oberflächenexpression inhibiert sein, könnten auch andere Zelltypen auf Oberflächenexpression nach Transduktion getestet werden, da die Expression von Nukleotidsequenzen abhängen könnte, welche eventuell speziesspezifisch erkannt werden, trotz hoher Sequenzähnlichkeit zwischen Maus- und Ratten-Singlechainmolekülen.

Irwin Griffith und Kollegen, sowie andere Gruppen, berichteten 1987, dass strukturelle Mutationen sowohl den intrazellulären Transport, als auch die Oberflächenexpression bei murinen Klasse II Molekülen beeinflussen können. Gerade die transmembrane Domäne der β -Kette von murinen MHC Klasse II Molekülen scheint relevant, zumindest für eine funktionelle Antigenpräsentation (Laufer et al., 1997). Jedoch sind die dort beschriebenen Mutationen beim hier verwendeten RT1B¹ Molekül nicht gefunden worden. Auch stellen Unterschiede bei einigen einzelnen Aminosäuren, z.B. im Signalpeptid oder auch der extrazellulären α und β -Domäne, zwischen IA^d und RT1B¹, eine mögliche Ursache einer geänderten Konformation oder Oberflächenexpression dar. Diese sind zwar gering, könnten jedoch beim artifiziellen Charakter der Moleküle funktionell in Erscheinung treten. Da aber das eine Konstrukt zumindest auf Proteinebene intrazellulär nachgewiesen werden konnte, das andere Konstrukt jedoch nicht, ist eine schlüssige Erklärung schwierig.

Von der Gruppe um Burrows et al., erschien vor kurzem eine Veröffentlichung, die die Grundlagen der Inhibierung der CD4⁺ T-Zellen im Signaltransduktionsweg untersucht hat. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass rekombinante TCR Liganden direkt an den TCR binden und das T-Zellverhalten durch einen partiellen Aktivierungsmechanismus, der spezifische Signalkaskaden auslöst, modifiziert. Dabei werden intrazelluläre Kalziumdepots geleert, ohne eine volle Aktivierung der T-Zellen zu erhalten. Die resultierende antigenspezifische Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFAT, entkoppelt von NF- κ B oder anderen extrazellulär Signal regulierten Kinasen, stellt dabei ein einzigartiges Signalaktivierungsmuster dar, welches anscheinend für die inhibitorischen Effekte von rekombinanten TCR Liganden auf enzephalitogene CD4⁺ T-Zellen verantwortlich ist.

Ein weiterer innovativer Ansatz zum Einsatz von MHC Klasse II Singlechain Molekülen stellen sogenannte MHC-IgG3 Fusionsproteine dar. Zuo et al. zeigten 2002, dass mit diesen rekombinanten Molekülen ebenfalls gezielt spezifische T-Zellen gebunden und anergisiert werden können.

Bei der bisher gänzlich unbekanntem Art der Faltung solcher Singlechain Moleküle, transgene RT1B¹ Singlechain Moleküle direkt zu detektieren bleibt schwierig. Da in dem hier dargestellten Molekül, welches auf der Veröffentlichung von Rhode et al., 1996 basierte, das

große Peptidbindungsstück wohl eine Art Verbindungsschleife zwischen der β - und α -Domäne darstellt, könnte dadurch auch die Bindung des spezifischen Antikörpers blockiert sein. Wichtig erscheint zuerst jedoch der Nachweis der erfolgreichen Transduktion oder der RNA Synthese, bevor man Aussagen zur OX-6 Bindung treffen kann. Dies ist besonders vor dem Hintergrund zu sehen, dass der Bindungsnachweis im Westernblot mit denaturierten Proteinen erfolgen kann.

Doch nicht nur der MHC, als klassisches Restriktionselement von T-Zell Antworten bietet sich als Singlechain Molekül für Studien zur Charakterisierung der T-Zellspezifität und T-zellaktivierung an. Auch der T-Zellrezeptor selber, als ebenso wichtiges Element der spezifischen Immunantwort, ist für den Einsatz als chimäres Singlechain Molekül interessant.

McMahan und Kollegen beschrieben Anfang 2003 einen vielversprechenden Ansatz löslicher Singlechain TCR-Moleküle. Sie zeigten, dass es auch möglich ist, über ein *Escherichia coli* Expressionssystem ein lösliches Ratten-Singlechain Molekül eines TCR, welcher spezifisch für ein enzephalitogenes Peptid ist, zu generieren. Das eingesetzte Molekül besteht aus der $V\alpha$ Domäne eines von C14 abstammenden TCR, die über einen 15 aa Verbindungsstück mit einer $V\beta 8.2$ Domäne des gleichen TCR verbunden wurde. Der so generierte C14 Singlechain-TCR war in der Lage, lösliche Ratten MHC Moleküle, die kovalent mit Antigen beladen waren, spezifisch zu binden (McMahan et al., 2003).

5.5. Einsatz RT1B¹ und CD28 transduzierter Zelllinien zur Untersuchung des Beitrags der CDRs zur Super- und Antigen-spezifität von RT1B¹ restringierten BV8S2⁺ Zellen in der LEW-Ratte

Superantigene (SAg) sind starke T-Zellstimulantien, die von Bakterien, Viren oder Mycoplasmen produziert werden. Sie rufen eine massive T-Zellproliferation über die TCR β abhängige, simultane Interaktion mit MHC und TCR hervor. SAg unterliegen keiner Prozessierung und sind für zahlreiche pathogene Erscheinungen, wie das toxische Schocksyndrom oder Lebensmittelvergiftungen. Neuerdings mehren sich Vermutungen, welche den SAg auch eine pathogene Rolle bei Autoimmunerkrankungen zuschreiben. Die am besten charakterisierte Gruppe von SAg sind sogenannte pyrogene bakterielle SAg,

welche einen hohen Grad an genetischer Variation bei einer gemeinsamen Struktur nutzen, um viele MHC Allele zu binden und somit eine starke T-Zellstimulation hervorzurufen.

Die vorliegende Arbeit analysierte den Beitrag der CDR2 und CDR4 Regionen des BV8S2 Allels der Lewisratte in Bezug auf die Erkennung des Autoantigens gpMBP und der drei Superantigene SEB/SEC1, MAS und YPM. Dies erfolgte durch eine Untersuchung polyklonaler T-Zellpopulationen und gezielter Mutagenese eines gpMBP spezifischen TCRs. Für die Analyse auf klonaler Ebene wurde der gpMBP spezifische TCR 35/1 kloniert und exprimiert. Dieser TCR zeigt strukturelle Eigenschaften eines enzephalitogenen RT1B¹ restringierten gpMBP₆₈₋₈₈ nachgewiesenen T-Zellklons und T-Zelllinien, wie z.B. die verwendeten V-Gensegmente und CDR3 Motife, sowie eines TCR, der in zellulären Infiltraten des ZNS bei EAE Lewisratten (Buenafe et al., 1997 und Gold et al., 1996).

Die funktionelle Expression des TCR an der Oberfläche mehrerer definierter Zelllinien und die Mutagenese der CDR2 und/oder CDR 4 Regionen zeigten deutlich, dass der Austausch des BV8S2 spezifischen Teils des TCR durch das ähnliche BV8S4 V-Gen zu einem vollständigen Verlust der gpMBP Erkennung führte. Dies stimmt mit den von Gold et.al. und Bourque et al. gezeigten Daten überein, die zeigten, dass der gpMBP spezifische BV8S4 TCR in einigen Eigenschaften von dem ebenfalls gpMBP spezifischen BV8S2 TCR unterscheidet. Darüber hinaus wurde in der Arbeit gezeigt, dass der Verlust der gpMBP Antigenpezifität aufgrund von Veränderungen in der CDR2 und nicht der CDR4 erfolgt. Daten aus Kristallstrukturanalysen von MHC Klasse II und TCR belegen einen Kontakt der CDR2, jedoch nicht der CDR4, mit dem MHC Klasse II Molekül (Rudolph et al., 2002). Es besteht die Vorstellung, dass MHC spezifische Selektion des BV8S2 und BV8S4 TCR eher aufgrund von Unterschieden in der CDR2, als in der CDR4, oder Bereichen des TCR, die nicht BV kodiert sind, erfolgt (Herrmann et al., 1999). Jedoch gibt es bis heute keinen formalen Beweis dieser Hypothese, welche weitere *in vivo* Studien mit mutierten TCRs verlangt.

Die Analyse der SAg Reaktivität von polyklonalen T-Zellpopulationen zweier unterschiedlicher *Tcrb* Haplotypen der BV8 Familie zeigte einerseits eine genetische Überlappung der SAg Spezifität und klare Unterschiede zwischen eng verwandten BV Elementen andererseits. Für das Superantigen SEB wurden dabei die mit SEB und SEC1 ermittelten Ergebnisse von Gold et al. und Herrmann et al. bestätigt. Die unterschiedliche Reaktivität von BV8S2 und

BV8S4 wurde durch Analyse des mutagenisierten 35/1 TCR, welcher die Reaktivität für SEC1 nach Austausch der CDR2 und/oder CDR4 aus dem reaktiven BV8S2 mit dem areaktiven BV8S4, verlor. Dieses Ergebnis unterstützt Beobachtungen von homologen Maus und humanen TCR, bei denen ebenfalls TCR Mutagenese, Bindungsstudien und Kristalle eingesetzt wurden (Sundberg et al., 2002). Kontakte von Aminosäuren an homologen Positionen wurden in den SEB und SEC1/TCR Kristallen nicht gefunden. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass diese Substitutionen nicht direkt mit der SEB Bindungsstelle interferieren, jedoch zu einer Konformationsänderungen von Bereichen führen, die indirekt mit der SEB Bindung interferieren.

Für das Superantigen MAS wurde eine klare BV8S2 Antwort nachgewiesen. BV4S4, das sich hauptsächlich in der CDR2 und CDR4 von BV8S2 unterscheidet, zeigte keine Antwort auf MAS. Bis jetzt gab es keine strukturelle Informationen, der in die MAS Erkennung involvierten BV Bereiche. Lediglich für den BV17 TCR (homolog zum Maus- und Rattenallel BV6) wurde ein Sequenzmotif beschrieben, welches ein Isoleucin direkt neben dem BV-Gen (BJ) zeigt und ein Tyrosin an Position 106 (Hodtsev et al., 1998). Diese Position kann auch beim MAS reaktiven TCR 35/1 nachgewiesen werden, wobei jedoch erwähnt sei, dass sich bei fast der Hälfte aller bei Mensch, Ratte und Maus vorkommenden BJ Elemente ein Tyrosin an dieser Position befindet. Veränderungen in der CDR2 und CDR4 von BV, welche am Rand des TCR lokalisiert sind und somit abseits der vermuteten SAg Bindungsstelle der CDR3, beeinflussen grundlegend die MAS Reaktivität. Interessant und in klarem Kontrast zur Aktivierung des TCR durch SEC1, können nur Änderungen beider CDR gleichzeitig zum Verlust der MAS Reaktivität führen. Dies kann auf einen Effekt zurückzuführen sein, bei dem zwei relativ schwache Bindungsstellen verloren gehen. Ebenfalls könnten indirekte Effekte, wie eine Interaktion der mutierten CDRs miteinander oder konformelle Unterschiede in anderen Bereichen des TCR für den Verlust der MAS Reaktivität verantwortlich sei.

Für YPM als SAg liegen bis heute die wenigsten Informationen in Bezug auf TCR und MHC Bindung vor. Jedoch wurde in der Arbeit gezeigt, dass TCR transgene Zelllinien wesentlich besser aktiviert werden, wenn YPM über MHC Klasse II exprimierende humane Zellen, als über Rattenzellen exprimiert wird, was auf eine bessere Bindung von YPM an humanes

Klasse II hinweist. Dies unterstützt auch die These, dass eine gute Präsentation zur Rolle von YPM als Virulenzfaktor in humanen Infektionen beiträgt.

Die Analyse der polyklonalen Stimulation in Mensch und Maus zeigt ein sehr ähnliches Muster von YPM spezifischen BV Genen (Maus BV7, 8S1, 8S2, 8S3 und human BV3, 8, 13 und 17) und von SEB spezifischen BV Genen (Maus BV7, 8S1, 8S2, 8S3 und human BV3, 12, 13 und 17). Dies ist jedoch nicht der Fall für die Ratten BV8 Familie, bei der relativ geringe Änderungen zu großen Reaktivitätsänderungen führen.

Eine polyklonale Stimulation von Lewisratten Lymphozyten zeigte eine extreme Selektivität der BV8S2 Antwort auf YPM, mit einem Anteil von teilweise über 80% BV8S2⁺ Zellen der aktivierten Zellen, verglichen mit 5% Ausgangsprozentsatz. Außerdem zeigte sich ein vollständiger Verlust der YPM Reaktivität von BV8S3 Zellen. Die Analyse von F344 BV8S4 Zellen und der BV8S4 ähnlichen BV8S2 CDR2+4 Doppelmutante zeigte eine sehr gute Antwort der BV8S4, welche gegenüber SEB und MAS fast vollständig areaktiv waren (persönliche Mitteilung von Prof.Dr.Herrmann).

Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich vermuten, dass die CDR2 und CDR4 nur eine geringe Rolle, wenn überhaupt, in der YPM Erkennung von BV8S2/4 Zellen spielen. Weitere TCR Mutagenese Studien werden sicherlich den Beitrag relevanter, die Reaktivität beeinflussende Regionen zur Bindung von YPM klären.

Generell zeigt die Analyse der Superantigenantwort der Ratten BV8 Genfamilie die Unterschiede in der strukturellen und funktionellen Art der Erkennung durch Verwendung von hoch homologen TCR unterschiedlicher BV Allele. Unterschiede in der SAg Aktivierung wurden bereits für mtv und Staphylococcus enterotoxine mit TCR- und TCR Mutanten durch TCR-SAg Kristallkomplexanalysen gezeigt (Sundberg et al., 2002 und Li et al., 1999).

Trotzdem bewirken diese unterschiedlichen Bindungsarten der SAg eine effektive T-Zellaktivierung. Es liegt die Vermutung nahe, dass ein starker evolutiver Druck eine BV vermittelte Art massiver T-Zellaktivierung durch mikrobielle Produkte aufrechterhält.

Es stellt sich ebenso die Frage, inwieweit eine nicht stringente SAg / MHC Bindung zu unterschiedlichen Antworten des Immunsystems führt. Zu einem gewissen Teil scheint das der Fall zu sein, so beschreibt Bernatchez et al. 1997 eine differenzierte Antwort von

Monozyten auf SEB und MAS, was auf eine unterschiedliche Valenz in der SAg Bindung zurückzuführen sein könnte (monovalent für SEB, bivalent für MAS). Desweiteren berichtete Herrmann et al. 1992 von einer unterschiedlichen T-Zellantwort, wobei nur SEB eine cytolytische T-Zellantwort hervor rief, jedoch nicht mtv-7.

Bisherige Ergebnisse aus der Literatur und die hier zusätzlich in dieser Arbeit ermittelten, legen die Vermutung nahe, dass die Bindungsstellen unterschiedliche Superantigene an die jeweiligen V-Segmente der T-Zellrezeptor β -Kette nicht identisch sind, aber dass dennoch ein einheitlicher Mechanismus der Interaktion zwischen Superantigen und TCR zugrunde liegt.

5.6. Einsatz von RT1B¹ und CD28 exprimierenden Zelllinien zur Etablierung eines kalibrierten Zellsystems zur Untersuchung $\gamma\delta$ T-zell-aktivierender Substanzen

Humane $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen eine wichtige Brückenfunktion zwischen angeborener und adaptiver Immunität einzunehmen. Sie zeigen eine spezielle Art der Antigenerkennung und besitzen Eigenschaften, die sich deutlich von denen der $\alpha\beta$ T-Zellen unterscheiden. Um diese Eigenschaften umzusetzen, erkennen $\gamma\delta$ T-Zellen kleine, phosphorylierte nicht Peptid-liganden, wie Bisphosphonate oder Alkylamine und sind nicht klassisch MHC restringiert. Die Erkennung dieser Nichtpeptidliganden korreliert mit der Expression der $V\gamma_9$ und $V\delta_2$ Gensegmente und ist durch eine klonale T-Zellexpansion gekennzeichnet, welche keinen vorhergehenden Antigenkontakt benötigt.

Die Art der Ligandenpräsentation und in die Ligandenerkennung speziell involvierte Komoleküle bleiben bis heute ungeklärt, benötigen jedoch Zell-Zell Kontakt oder die Kostimulation von bei der Stimulation benachbarter Zellen (Allison et al., 2001). Ebenso unbeantwortet bleibt die Frage nach relevanten tumorassoziierten Liganden.

In den Untersuchungen wurde ein in seiner Ligandenspezifität charakterisierter $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR mittels retroviralen Gentransfers in ein T-Zellrezeptor negatives Maus T-Zellhybridom und eine T-Zellrezeptor negative humane Leukemie T-Zelllinie transferiert, um so definierte Indikatorzelllinien zu generieren, durch die weitere Untersuchungen von Tumor- und Infektionsassoziierten Antigenen möglich werden. Dabei dienten mit dem hier untersuchten

transgenen RT1B¹ Molekül transduzierte Zelllinien und mit transgenem $\alpha\beta$ TCR transduzierte Zelllinien im weiteren Verlauf der Experimente als Basis für ein definiertes System, um eine schlechtere Ligandenpräsentation der verwendeten APCs, welche auf spezifischen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien beruhen könnte, auszuschließen. Ebenso wurde durch Kotransduktion von humanem und Maus/Ratten CD28 (bzw. CD80) Molekülen der Einfluss kostimulatorischer Moleküle auf die Ligandenerkennung untersucht.

Zuerst konnte hierbei eine Oberflächenexpression des durch retroviralen Transfer transduzierten humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR sowohl auf einem T-Zellrezeptor negativen Maus T-Zellhybridom (BW58C) nachgewiesen werden.

Um die Stimulationsfähigkeit und den Einfluß des CD28 Moleküls auf die Erkennung von Nichtpeptidliganden der mit humanen $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR transduzierten Zellen zu überprüfen, wurden $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR exprimierende und $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR und CD28 exprimierende BW Zellen mit Rajizellen mit und ohne Phospholigand HPPBr stimuliert und anschließend der IL-2 Gehalt des Kulturüberstands gemessen. Dabei konnte bei den CD28^{-/-} Transduktanten sogar in Anwesenheit des Antigens und Rajizellen keine IL-2 Produktion nachgewiesen werden. Jedoch zeigten CD28 exprimierende Transduktanten eine starke IL-2 Antwort nach Stimulation mit Antigen in Gegenwart von Rajizellen. Dies belegt einen starken kostimulatorischen Einfluss von CD28 auf die Reaktivität der eingesetzten Transduktanten. Die nachgewiesene Induktion von IL-2 war dabei jedoch abhängig von der Gegenwart humaner (Raji) antigenpräsentierender Zellen, aber nicht von murinen Mastocytomzellen (P815/P80) und murinen B-Zellen. Ebenfalls konnte bei Verwendung von $\alpha\beta$ TCR transduzierten CD28 positiven BW58 Zellen, als auch bei Maus bzw. Ratten ConA und LPS Blasten keine IL-2 Induktion nachgewiesen werden.

Diese erstmalige Beschreibung eines heterologen Systems der $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR Ligandenerkennung bzw. Präsentation eröffnet neue Möglichkeiten zur Identifizierung von für die Phosphoantigen induzierte T-Zellaktivierung essentiellen Molekülen.

Da sich weiterhin die Frage nach der Art der Präsentation von Nichtpeptidliganden und deren Erkennung stellt, können ausgehend von den in dieser Arbeit generierten Zelllinien Mutagenesestudien des verwendeten TCR durchgeführt werden. Dabei könnten als Grundlage jüngst publizierte molekulare Modellierungsstudien zur Phosphoantigen-TCR, sowie SEA-

TCR Interaktion dienen, welche potentielle Bindungsbereiche definierten (Morita et al., 2001). Dies würde die Generierung definierter, informativer TCR Mutanten ermöglichen, welche relativ einfach über das hier beschriebene retrovirale Transfektionssystem in definierte Empfängerzelllinien, wie BW, exprimiert und funktionell getestet werden könnten.

Ebenso interessant wäre die Generierung und der Einsatz löslicher TCR Oligomere über bakterielle- oder Insektenzell-Expressionssysteme. Die geplante Oligomerisierung würde eine höhere Avidität für die Ligandenerkennung bedeuten, welche zum direkten Nachweis der zellulären Liganden (Phosphoantigen+unbekannte zelluläre Komponente) genutzt werden könnte.

Neben der Manipulation des $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR soll das oben beschriebene heterologe System zur Identifizierung von Molekülen, die für die Phosphoantigen (z.B. Zoledronat) induzierte $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR Aktivierung essentiell sind, Anwendung finden. Dies könnte durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Phosphoantigen gepulste Raji Zellen oder noch zu identifizierende Phosphoantigen präsentierende Zelllinien geschehen. Als experimenteller Ansatz wäre dabei zunächst an den Nachweis der Inhibition der durch Phosphoantigen induzierten IL-2 Produktion der transduzierten Mauszelllinie BW zu denken. Weiterhin könnte eine mögliche Inhibition der Stimulation durch andere $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR Liganden, wie Raji Zell präsentiertes SEA, untersucht werden. Als Kontrolle würde sich auch die Überprüfung einer möglichen Inhibition von $\alpha\beta$ TCR exprimierenden Zelllinien durch solche monoklonalen Antikörper anbieten. Somit könnte getestet werden, ob die Unterdrückung der Phospho-antigen induzierten IL-2 Produktion tatsächlich durch Inhibition kostimulatorischer Moleküle oder Adhäsionsmoleküle zurückzuführen ist.

Die Erkennung von Nichtpeptidantigenen, wie Prenylphosphaten und ihren synthetischen Analoga ist auf $V\gamma_9/V\delta_2$ TCR exprimierende T-Zellen beschränkt. Dies wurde von Davodeau et al., 1993 und Tanaka et al., 1994 durch Färbungen von *in vitro* expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt. In den Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Fähigkeit der Prenylphosphaterkennung auf eine TCR negative Empfängerlinie übertragen werden kann. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt. In Bezug auf die molekulare Basis der Prenylphosphaterkennung ist bekannt, dass die Reaktivität von der CDR3 Region der $V\delta_2$ und deren Präsenz abhängig ist (Morita et al, 1999). Dies lässt auf eine Ähnlichkeit der $\gamma\delta$ TCR Erkennung mit der MHC /Peptid Erkennung schließen, wobei Änderungen in der CDR3 zu

einer Modulation oder sogar zum Verlust der Nichtpeptidliganden führen könnten. Ebenso ist die Erkennung unterschiedlich im Vergleich zur klassischen Erkennung von Superantigenen durch $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ TCR, welche abhängig vom exprimierten $V\beta$ oder $V\gamma$ Gensegment ist (Loh et al., 1994).

Da diese Nichtpeptidliganden ubiquitär vorkommen stellt sich die Frage, warum in Abwesenheit von Infektionen $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen nicht permanent proliferieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Mengen und Qualitäten an Antigenen, welche *in vivo* als Folge von Umwelteinflüssen oder bakteriellen Metabolismusvorgängen auftreten, zu niedrig sind, um Effektorfunktionen zu aktivieren, jedoch hoch genug, um $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen in einem „Bereitschaftszustand“ zu halten. Dieser Zustand wäre vorteilhaft, um bei einer Infektion durch pathogene oder opportunistische Bakterien, welche dann aktivierende Antigene in entsprechenden Mengen produzieren, eine schnelle erste Reaktion durch T-Zellen zu bewirken (Das et al., 2001).

Eine gegensätzliche Erklärung für die apparente Toleranz von $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen gegenüber schwankenden Antigenmengen ist, dass $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen ein zusätzliches Signal benötigen, welches ihnen die Sekretion von Zytokinen, Proliferation und Zytotoxizität ermöglicht. $\alpha\beta$ T-Zellen besitzen dieses Signal: den kostimulatorischen Rezeptor CD28. Die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren kein CD28 (Lafont et al., 2000). Das und Kollegen zeigten 2001, dass eine CD28-B7 funktional analoge Rezeptor-Liganden Interaktion von $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zellen benutzt wird. Diese NKG2D-MICA Interaktion verstärkt dabei auch die $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zell vermittelte Antwort auf virale Antigene (Groh et al., 2001).

MICA ist ein durch Stress induzierbares Oberflächenmolekül auf dendritischen und epithelialen Zellen, welches nach *M. tuberculosis* Infektionen exprimiert wird. Die anschließende Interaktion von MICA und NKG2D führt zu einem starken Anstieg der TCR abhängigen $V\gamma_9/V\delta_2$ T-Zell Antwort auf Nichtpeptidantigene oder Superantigene.

Die NKG2D-MICA Interaktion scheint essentiell für eine effektive angeborene Immunantwort auf mikrobiell assoziierte Antigene zu sein, welche konstitutiv *in vivo* exprimiert werden.

Es bleibt weiterhin unklar, ob ein präsentierendes Molekül für Nichtpeptidantigene existiert. Prenyl-Pyrophosphate können, wie von Morita et al., 1995 gezeigt wurde, über einen

neuartigen extrazellulären Weg präsentiert werden, der weder Antigenaufnahme noch Antigenprozessierung benötigt. Jedoch besteht die Notwendigkeit von Zell-Zell Kontakt in diesem Weg was die Vermutung nahe legt, dass ein Zelloberflächenkomplex, ähnlich wie bei $\alpha\beta$ T-Zell Antworten, erkannt wird.

Auch die Wirkung anderer, noch nicht definierter hochpotenter Liganden ist in Betracht zu ziehen. Ebenso spielen die vorhandenen Konzentrationen der Liganden eine essentielle Rolle, wobei die Konzentration im Status einer Nichtinfektion zu gering sein kann, jedoch durch eine Infektion rasch auf aktivierende Schwellenwerte ansteigen kann.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion des Ratten MHC Klasse II Moleküles RT1B¹ und des von ihm präsentierten Autoantigens basisches Myelinprotein (MBP) mit autoreaktiven TCR charakterisiert werden. Von besonderem Interesse war dabei die Interaktion mit dem TCR 35/1, der typisch für TCR ist, die in der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) der LEW Ratte vermehrt zu finden sind. Zu diesem Zweck wurden zuerst verschiedenen Zelllinien mit RT1B¹ Genen transduziert und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, spezifischen T-Zellen funktionell und restringiert Antigen zu präsentieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene Zelllinien, welche mit Ratten Klasse II Genen transduziert wurden, in der Lage sind, spezifischen T-Zellen funktionell und restringiert Antigen zu präsentieren.

Weiterhin wurde ein mutiertes RT1B¹ Molekül, welches eine α -Kette mit dem Aminosäureaustausch V38M aufwies, auf seine Oberflächenexpression und Funktionalität untersucht, um Hinweise auf die Bedeutung dieser Position im Kontext der MHC/Antigen/TCR Bindung zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass die Qualität der Oberflächenexpression von der jeweiligen transduzierten Zelllinie abhängig war. Jedoch war selbst bei guter Oberflächenexpression die Fähigkeit Antigen zupräsentieren stark eingeschränkt. Diese eingeschränkte Funktionalität konnte jedoch durch ein kovalentes Verbinden des Antigens MBP an die β -Kette des mutierten RT1B¹ deutlich verbessert werden, was zeigt, dass sterische Hinderungen, welche zur Einschränkung der Funktionalität führen, durch kovalent gebundene Antigene verbessert werden können.

Natives RT1B¹, ebenfalls zusätzlich mit kovalent gebundenem Antigen, wurde im weiteren Verlauf der Experimente auch therapeutisch, auf Zellen exprimiert, genutzt. Für die Untersuchungen wurde hier das P80-System eingesetzt. Die Gene des MHC-Klasse II Molekül RT1B¹, wurden retroviral transferiert und diese transgenen Zellen mit dem enzephalitogenem Peptidepitop von MBP₆₈₋₈₈ beladen (auch kovalent gebunden mit MBP₇₁₋₉₀). Daraufhin wurden die möglichen therapeutischen Effekte dieser Zellen im klinischen Verlauf der EAE bei Lewis-Ratten, nach adoptivem Transfer, charakterisiert und analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass P80 Zellen, welche RT1B¹ mit kovalentem MBP exprimieren, den Verlauf einer AT-EAE deutlich verbessern können.

Als weiterer Ansatz zur Charakterisierung der Interaktion des Ratten MHC Klasse II Moleküles RT1B¹ und des von ihm präsentierten Autoantigens basische Myelinprotein (MBP) mit autoreaktiven TCR wurden lösliche MHC Klasse II -artige Moleküle hergestellt und ihre Peptid- und TCR-Bindung bestimmt. Darüber hinaus wurden artifizielle MHC Klasse II Konstrukte, welche mit einem antigenen Peptid kovalent verbunden sind, generiert, in verschiedenen Zellen exprimiert und ihre T zellstimulatorische bzw. immunmodulatorische Kapazität *in vitro* und *in vivo* getestet und mit der RT1B¹ Mutante verglichen. Bis zum Abschluss der Arbeit konnten jedoch nur wenige Daten mit diesen Molekülen erzielt werden, was Aussagen zur Expressionsfähigkeit und Funktionalität dieser Moleküle erschwert. Ebenfalls wurde im Rahmen einer Kooperation begonnen, RT1B¹-Tetramere zu generieren, welche in weiteren Test Verwendung finden sollen.

Um Aufschluß über die relevanten Bereiche der Erkennung diverser Superantigene des TCR zu erhalten, wurde der TCR 35/1, sowie Varianten dieses TCR mit mutierten CDR der TCR- β -Kette in Ratten CD28 positiven T-Zelllinien exprimiert und die Aktivierung durch unterschiedliche Liganden, besonders Superantigene, charakterisiert.

Hierzu diente das in der EAE der Lewisratte präferentiell exprimierte T-Zellrezeptorgen BV8S2 (V β 8.2) im Vergleich mit dem hoch homologen BV8S4 Gensegment.

Dabei zeigte sich ein generelles Bild des Beitrags der CDR2 und CDR4/HV4 zur Reaktivität der Antigen- und Superantigenerkennung des T-Zellrezeptors des Hybridoms 35/1: Der Wildtyp TCR antwortete auf alle Liganden. Die CDR2 Mutante nur auf MAS und YPM, jedoch nicht auf gpMBP und SEC1. Die CDR4 Mutante antwortete auf gpMBP, MAS und YPM, jedoch nicht auf SEC1. Die CDR2+4 Mutante reagierte nur auf YPM, jedoch keinen anderen Liganden.

Schließlich wurde untersucht, inwieweit die Expression von CD28 die für die Aktivierung von $\gamma\delta$ TCR transduzierten T-Zelllinien durch $\gamma\delta$ TCR Liganden essentiell ist. Hier konnte nach der Expression von humanem V γ_9 /V δ_2 TCR auf der Zelloberfläche von BW Zellen, eine klare CD28 Abhängigkeit der Ligandenerkennung nachgewiesen werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Erkennung des Bisphosphonat-Liganden Zoledronat nur in Gegenwart humaner B-Zellen zur IL-2 Produktion führt, nicht aber in Gegenwart muriner Zelltypen.

Somit konnten über diese Daten erste Erkenntnisse für ein heterologes System, zur Beschreibung der V γ_9 /V δ_2 Ligandenerkennung und Ligandenpräsentation, gewonnen werden.

7. Abstract

In this work, the interaction of rat MHC class II molecule RT1B¹ and its presented autoantigen MBP (basic myelin protein) with the corresponding autoreactive TCR was investigated. Of special interest was the interaction of TCR 35/1, a TCR type that is very commonly found in the EAE of the Lewis rat. For this purpose different cell lines were transduced with the RT1B¹ genes and then checked for their ability to present functional and restricted antigen to specific T-cells. It was shown, that different cell lines, transduced with RT1B¹ genes, gained the ability to present antigen in a functional and restricted manner.

Furthermore a RT1B¹ mutant, consisting of an alpha chain with an amino acid exchange (V38M) was investigated regarding its surface expression and functionality. It was done to characterize this position with regard to MHC/TCR/antigen interaction. It was pointed out that the quality of the surface expression was in dependence on the different transduced cell lines. But despite a good expression the ability to present antigen was reduced. This reduced quality in antigen presentation could be rescued with a covalently linked MBP antigen at the β chain of the mutated RT1B¹ molecule. This proved that steric inhibitions leading to reduced functionality were overcome or at least improved with covalently bound antigen.

In further experiments, native RT1B¹ and in addition RT1B¹ with covalently bound antigen, was expressed on cells and therapeutically used. These experiments were done within the P80 system. RT1B¹ genes of α and β chain were transduced via a retroviral transfection system and the transgenic cells loaded with the encephalitogenic epitope of MBP68-88 (MBP71-90 was covalently linked). Then the possible therapeutic effects of these cells were analysed regarding the clinical course after adoptive transfer of EAE in Lewis rats. It was demonstrated, that P80 cells, expressing RT1B¹ with covalently linked MBP, improved the clinical course of an AT-EAE in Lewis rats drastically.

As an additional approach for characterizing the interaction of MHC class II molecule RT1B¹, MBP and its autoreactive TCR, soluble MHC class II like molecules were generated and their peptide and TCR binding determined and characterized. Furthermore artificial MHC class II constructs, loaded with covalently bound antigen, were generated and expressed in different cell lines and their immunomodulatory capacity *in vitro* and *in vivo* tested and compared with the RT1B¹ mutant. Only few data could be achieved with these molecules. This makes

statements regarding the expression and functionality of these molecules more difficult. Also in a cooperation, the generation of tetrameric RT1B¹ molecules was started. These tetramers will be applied in further cooperative studies.

To get further informations about the relevant areas of the recognition of different superantigens of the TCR, the 35/1 TCR as well as variations of this TCR with mutated CDRs of the β chain were expressed in rat CD28⁺ T-cell lines. Then the activation through different ligands especially SAg, was investigated.

For this the preferentially in EAE of Lewis rat expressed T-cell receptor gene BV8S2 was compared with the highly homologue BV8S4 gene segment. A general contribution of CDR2 and CDR4/HV4 to the reactivity of the antigen and SAg recognition of the TCR of the 35/1 hybridoma was observed:

Wild type TCR responded well to all ligands. The CDR3 mutant responded to MAS and YPM, but not to gpMBP and SEC1. The CDR4 mutant responded to gpMBP, MAS and YPM, but not to SEC1. The CDR2+4 mutant responded only to YPM.

In a different topic of this work, the importance of CD28 expression for the activation of γ/δ TCR transduced cell lines through γ/δ ligands was investigated. After expression of human γ/δ TCR on the surface of BW cells, a clear CD28 dependence on ligand recognition was shown. Furthermore bisphosphonate (Zoledronate) recognition led only to IL-2 production in the presence of murine cell types. With these first data, a basis for a heterologous cell system for characterizing γ/δ ligand recognition and presentation was generated.

8. Literaturverzeichnis

- Abastado, J.-P., Ojcius, D., Yeh, P., Schomacher, T., Ploegh, H. und Kourilsky, P. (1993) A soluble single chain K^d molecule produced by yeast selects a peptide repertoire indistinguishable from that of cell-surface associated K^d. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1776
- Adami, S. und Zamberlan, N. (1996) Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Safety* **14**, 158-170.
- Allison, T.J., Winter, C.C., Fournie, J.-J., Bonneville, M. und Garboczi, D.N. (2001) Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* **411**, 820-824
- Asarnov, D. M., Kuziel, W. A., Bonyhadi, M., Tigelaar, R. E., Tucker, P. W. und Allison, J. P. (1988) Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy-1⁺ dendritic epidermal cells. *Cell* **55**, 837-847.
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. und Yokota, T. (1990) Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 783
- Asmuß, A., Hofmann, K., Hochgrebe, T., Giegerich, G., Hünig, T. und Herrmann, T. (1996) Alleles of highly homologous rat T-cell receptor β chain variable segments 8.2 and 8.4. Strain specific expression, reactivity to superantigens and binding of the monoclonal antibody R78. *J. Immunol.* **157**, 4436
- Bandeira, A., Itohara, S., Bonneville, M., Burlen-Defranoux, O., Mota-Santos, T., Coutinho, A. und Tonegawa, S. (1991) Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T-cell antigen receptor $\gamma\delta$. *PNAS* **88**, 43-47.
- Bath, T.N., Bentley, G.A., Boulot, G., Greene, M.I., Tello, D., Dall'Acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F.P., Mariuzza, R.A. und Poljak, R.J. (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *PNAS* **91**, 1089-1093

- Behr, C., Poupot, R., Peyrat, M.-A., Poquet, Y., Constant, P., Dubois, P., Bonneville, M. und Fournié, J.-J. (1996) *Plasmodium falsiparum* stimuli for human $\gamma\delta$ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect. Immun.* **64**, 2892-2896.
- Beraud, E., Reshef, T., Vandenbark, A.A., Offner, H., Fritz, R., Chou, C.H., Bernard, D. und Cohen, I.R. (1986) Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by T Lymphocyte lines: genotype of antigen-presenting cells influences immunodominant epitope of basic protein. *J. Immunol.* **136**(2), 511-515
- Bernatchez, C., Al-Daccak, R., Mayer, P.E., Mehindate, K., Rink, L., Mecheri, S. und Mourad, W. (1997) Functional analysis of *Mycoplasma athritidis* derived mitogen interactions with class II molecules. *Infect. Immun.* **65**, 2000
- Bigby, M., Markowitz, J. S., Bleicher, P. A., Grusby, M. J., Simha, S., Siebrecht, M., Wagner, M., Nagler-Anderson, C. und Glimcher, L. H. (1993) Most $\gamma\delta$ T cells develop normally in the absence of MHC class II molecules. *J. Immunol.* **151**, 4465-3375.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samaraoui, B., Bennett, W.S., Strominger und Wiley, D.C. (1987) Structure of the human class I histo-compatibility antigen. *Nature* **329**, 506
- Bodgen, A.E. und Apetkman, P.M. (1960) The "R-1" factor: a histocompatibility antigen in the rat. *Cancer Res.* **20**, 1372
- Boismenu, R. und Havran, W. L. (1998) $\gamma\delta$ T cells in host defense and epithelial cell biology. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **86**, 121-133.
- Boots, A.M.H., Van Lierop, M.J., Wauben, M.H.M., Van Kootsen, P.J.S., Hensen, E.J. und Van Eden, W. (1991) CD4 ratxrat and mouse xrat T-cell hybridomas produced by fusion of established T-cell lines and clones to W/Fu (C58N)D. *J. Immunol. Methods* **144**, 1-10

- Bourque, M.M., Martin, A.M., Desquennes-Clark, L., Heber-Katz, E. und Blankenhorn, E.P. (1996) Possible mechanism for the TCR beta chain associated EAE resistance of LER rats. *J. Neurosci. Res.* **45**, 714
- Boyington, J.C., Riaz, A.N., Patamawenu, A., Coligan, J.E., Brooks, A.G. und Sun P.D. (1999) Structure of CD94 reveals a novel C-type lectin fold: implication for the NK cell associated CD94/NKG2 receptors. *Immunity* **10**, 75-82
- Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F. und Krangel, M. S. (1986) Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* **322**, 145-149.
- Brocke, P., Garbi, N., Momburg, F. und Hämmerling, G. (2002) HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 22-29
- Brossay, L. und Kronenberg, M. (1999) Highly conserved antigen-presenting function of Cd1d molecules. *Immunogenetics* **50**, 146-151
- Brown J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban R.G., Strominger, J.L. und Wiley D.C. (1993) Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **264**, 33
- Buenafe, A.C., Tsu, R.C., Bebo, B.J., Bakke, A.C., Vandenbark, A.A. und Offner, H. (1997) A TCR V alpha CDR-3 specific motif associated with Lewis rat autoimmune encephalomyelitis and basic protein specific T-cell clones. *J. Immunol.* **158**, 5472
- Buenafe, A.C., Weinberg, A.D., Culbertson, N.E., Vandenbark, A.A. und Offner, H. (1996) V beta CDR3 motifs associated with BP recognition are enriched in OX40⁺ spinal cord T-cells of Lewis rats with EAE. *J. Neurosci. Res.* **44**, 562
- Bukowski, J. F., Morita, C. T. und Brenner, M. B. (1994) Recognition and destruction of virus-infected cells by human $\gamma\delta$ CTL. *J. Immunol.* **153**, 5133-5140.

- Bukowski, J. F., Morita, C. T., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Brenner, M. B. und Band, H. (1995) V γ 2V δ 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J. Immunol.* **154**, 998-1006.
- Bukowski, J. F., Morita, C. T., Band, H. und Brenner, M. B. (1998) Crucial role of TCR γ chain junctional region in prenyl pyrophosphate antigen recognition by $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunol.* **161**, 286-293.
- Bukowski, J. F., Morita, C. T. und Brenner, M. B. (1999) Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* **11**, 57-65.
- Burrows, G.G., Bebo, B.F., Adlard, K.L., Vandenbark, A.A. und Offner, H. (1998) Two domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 that detect and inhibit rat encephalitogenic T-cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **161**, 5987
- Busch, R., und Mellins, E.D. (1996) Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 51
- Carena, I., Shamshiev, A., Donda, A., Colonna, M. und de Libero, G. (1997) Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor- γ/δ stimulated by nonpeptidic ligands. *J. Exp. Med.* **186**, 1769-1774.
- Castellino, F., Zappacosta, F., Coligan, J.E. und Germain R.N. (1998) Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J. Immunol.* **161**, 4048
- Chluba, J., Steeg, C., Becker, A., Wekerle, H. und Epplen, J.T. (1989) T-cell receptor β chain usage in myelin basic protein specific rat T-lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 279

- Cho, S., Attaya, M., Brown, M.G. und Monaco, J.J. (1991) New class II like genes in the murine MHC. *Nature* **353**, 673
- Chung, S., Wucherpfennig, K.W., Freidmen, S.M., Hafler, D.A. und Strominger, J.L. (1994) Functional three domain single chain T-cell receptors. *PNAS* **91**, 12654
- Claesson Welsh, L., Barker, P.E., Larhammer, D., Rask, L., Ruddle, F.H. und Peterson, P.A. (1984) The gene encoding the human class II antigen-associated gamma chain is located on chromosome 5. *Immunogenetics* **20**, 89
- Coico, R.F., Bhogal, B.S. und Thorbecke, G.J. (1983) relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J. Immunol.* **131**, 2254
- Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M. A., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M. und Fournié, J.-J. (1994) Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**, 267-270.
- Constant, P., Poquet, Y., Peyrat, M. A., Davodeau, F., Bonneville, M. und Fournié, J.-J. (1995) The antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is an attenuated mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic antigens for human $\gamma\delta$ T Cells. *Infect. Immun.* **63**, 4628-4633.
- Constant, S. L. und Bottomly, K. (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 297-322.
- Copier, J., Kleijmeer, M.L., Ponnambalam, S., Oorschot, V., Potter, P., Townsdale, J. und Kelly, A. (1996) Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J. Immunol.* **157**, 1017

- Correa, I., Bix, M., Liao, N. S., Zijlstra, M., Jaenisch, R. und Raulet, D. (1992) Most $\gamma\delta$ T cells develop normally in β_2 -microglobulin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 653-657.
- Cresswell, P. (1996) Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **46**, 1103
- Cresswell, P. und Ava, P.R. (1994) *In vivo* and *in vitro* formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain derived peptides. *Immunity* **1**, 763
- Critchfield, J.M., Racke, M.K., Zuniga-Pflucker, J.C., Cannella, B., Raine, C.S., Goverman, J. und Lenardo, M.J. (1994) T-cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **263**, 1139-1143
- Crithfield, J.M. und Lenardo, M.J. (1995) Antigen induced programmed T-cell death as a new approach to immune therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **75**, 13-9
- Das H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T. und Bukowski, J. (2001) MICA engagement by human V γ 9V δ 2 T cells enhances their antigen dependent effector function. *Immunity* Vol. **15**, 83-93
- Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J., Monaco, J.J., Butcher, G.W. und Howard, J.C. (1990) MHC class II region encoding proteins related to multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* **348**, 738
- Dressel, R., walter, L. und Günther E. (2001) Genomic and functional aspects of the rat MHC, the RT1 complex. *Immunol. Reviews* **184**, 82-95
- Dudley, E. C., Girardi, M., Owen und Hayday, A. C. (1995) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells can share a late common precursor. *Curr. Biol.* **5**, 659-669.
- Ermann, J. und Fathman, C.G. (2002) Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nature Immunol.* **Volume 2** No. 9

- Eylar, E.H., Jackson, J.J. und Kniskern, P.J. (1979) Suppression and reversal of allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys with basic protein and peptides. *Neurochem. Res.* **4(2)**, 249-258
- Ferrarini, M., Heltai, S., Toninelli, E., Sabbadini, M. G., Pelliari, C. und Manfredi, A. A. (1995) Daudi lymphoma killing triggers the programmed cell death of cytotoxic V γ 9V δ 2 T lymphocytes. *J. Immunol.* **154**, 3704-3712.
- Feurle, J., Jomaa, H., Bauer, E., Kunzmann, V., Schreier, P., Herderich, M. und Wilhelm, M. (1997a) A novel phosphat-bearing compound isolated from *E. coli* stimulates $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiol.* **197**, 148.
- Feurle, J., Jomaa, H., Bartram, C. R., Hansen-Hagge, T., Kunzmann, V., Bauer, E., Herderich, M. und Wilhelm, M. (1997b) $\gamma\delta$ T cell stimulation by bacterial antigens correlates with a non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Immunobiol.* **197**, 148-149.
- Fisch, P., Malkovsky, M., Kovats, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B. S. und Voss, S. D. (1990) Recognition by human V γ 9V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* **250**, 1269-1273.
- Fisch, P., Oettel, K., Fudim, N., Surfus, J. E., Malkovsky, M. und Sondel, P. M. (1992) MHC-unrestricted cytotoxic and proliferative responses of two distinct human $\gamma\delta$ T-cell subsets to Daudi cells. *J. Immunol.* **148**, 2315-2323.
- Fischer, S., Scheffler, A. und Kabelitz, D. (1996) Activation of human $\gamma\delta$ T cells by heat-treated mistletoe plant extracts. *Immunol. Lett.* **52**, 69-72.

- Fisher, J. E., Rogers, M. J., Halasy, J. M., Luckman, S. P., Hughes, D. E., Masarachia, P. J., Wesolowski, G., Russell, R. G. G., Rodan, G. A. und Reszka, A. A. (1999) Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 133-138.
- Fleischer, B., Gerardy, S.R., Metzroth, B., Carrel, S. und Köhler, W. (1991) An evolutionary conserved mechanism of T-cell activation by microbial toxins. Evidence for different affinities of T-cell receptor toxin interactions. *J. Immunol.* **146**, 11
- Fournié, J. J. und Bonneville, M. (1996) Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by phosphoantigens. *Res. Immunol.* **147**, 338-347
- Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E. und Wiley, D.C. (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-a2. *Nature* **384**, 134-141
- Garcia, V. E., Sieling, P. A., Gong, J. H., Barnes, P. F., Uyemura, K., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Morita, C. T. und Modlin, R. L. (1997) Single-cell cytokine analysis of $\gamma\delta$ T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J. Immunol.* **159**, 1328-1335.
- Garcia, V. E., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C. T. und Modlin, R. L. (1998) IL-15 enhances the response of human $\gamma\delta$ T cells to nonpeptide microbial antigens. *J. Immunol.* **160**, 4322-4329.
- Garcia, K.C., Degano, M., Pease, L.R., Huang, M., Peterson, P.A., Teyton, L., und Wilson I.A. (1996) Structural basis of plasticity in T-cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* **279**, 1166-1172
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L. und Wilson, I.A. (1996) An $\alpha\beta$ T-cell receptor structure at 2.5Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* **274**, 209-219

- Godeau, F., Luescher, I.F., Ojcius, D.M., Saucier, C., Mottez, E., Cabanie, L. und Kourilsky E. (1992) Purification of ligand binding of a soluble class I major histocompatibility complex consisting of the first three domains of H-2K^d fused to β_2 m-microglobulin expressed in the baculovirus insect cell system. *J. Biol. Chem.* **267**, 24223
- Gold, D.P., Surh, C.D., Sellins, K.S., Schroder, K., Sprent, J. und Wilson, D.B. (1994) Rat T-cell responses to superantigens. II. Allelic differences in V β 8.2 and V β 8.5 chains determine responsiveness to staphylococcal enterotoxin B and mouse mammary tumor virus encoded products. *J. Exp. Med.* **179**, 63
- Gold, D.P., Schroder, K., Mueller, D.B. und Wilson, D.B. (1996) Analysis of T-cell receptor beta chains in the rat: allelic polymorphism of V β 8.2 is not a predisposing genetic factor in susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **45**, 700
- Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G. Breitschopf, H. Hartung, H.P., Toyka, K.V. und Lassmann H. (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* **71(2)**, 219-225
- Gold, R., Hartung, H.P. und Toyka K.V. (1995) Therapy with immunoglobulins in neurologic autoimmune diseases. Indications and mechanisms of action. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* **63(1)**, 17-29
- Gold, R., Giegerich, G., Hartung, H.P. und Toyka K.V. (1995) T-cell receptor (TCR) usage in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis: TCR beta-chain-variable region V beta 8.2-positive T-cells are not essential for induction and course of disease. *PNAS* **92(13)**, 5850-5854
- Gold, R., Hartung, H.P. und Toyka, K.V. (2000) Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol. Med. Today* **6**, 88-91

- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R. und Spies, T. (2001) Costimulation of CD8 alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus infected cells. *Nat. Immunol.* **2**, 255-260
- Hara, T., Mizuno, Y., Takaki, T., Takada, H., Akeda, H., Aoki, T., Nagata, M., Ueda, K., Matsuzaki, G., Yoshikai, Y. und Nomoto, K. (1992) Predominant activation and expansion of V γ 9-bearing $\gamma\delta$ T cells *in vivo* as well as *in vitro* in *Salmonella* infection. *J. Clin. Invest.* **90**, 204-210.
- Hare, B.J., Wyss, D.F., Osburne, M.S., Kern, P.S., Reinherz, E.L. und Wagner, G. (1999) *Nat. Struc. Biol.* **6**, 4205-4216
- Haregewoin, A., Soman, G., Hom, R. C. und Finberg, R. W. (1989) Human $\gamma\delta^+$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* **340**, 309-312.
- Henkes, W., Syha, J. und Reske, K. (1988) Nucleotide sequence of rat invariant gamma chain cDNA clone pLR gamma. *Nucleic Acids. Res.* **16**, 11822
- Herman, A., Croteau, G., Sekaly, R.P., Kappler, J. und Marrack, P. (1990) HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T-cells. *J. Exp. Med.* **172**, 709
- Herrmann, T., Hochgrebe, T., Torres-Nagel, N.E., Huber, B.T. und Hünig, T. (1994) Control of the rat T-cell response to retroviral and bacterial superantigens by class II MHC products and Tcrb-V β 8.2 alleles. *J. Immunol.* **152**, 4300
- Herrmann, T., Hofmann, K., Torres-Nagel, N.E., Hünig, T. und Wonigeit, K. (1999) CD4/CD8 subset specific expression of highly homologous rat Tcr β -V8 family members controlled by CDR2 and/or CDR4 (HV4) mediated MHC class specific preferences in thymic selection. *Int. Immunol.* **11**, 101

- Herrmann, T., Waanders, G., Chvatchko, Y. und MacDonald, H.R. (1992) The viral superantigen Mls1^a induces interferon γ secretion by specifically primed CD8⁺ cells but fails to trigger cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2171
- Hinkkanen, A.E., Maatta, J., Qin, Y.F., Linington, C., Salmi, A. und Wekerle, H. (1993) Novel TCR TCR α -V and -J transcripts expressed in rat myelin specific T-cell lines. *Immunogenetics* **37**, 235
- Hodtsev, A.S., Choi, Y., Spanoupoulou, E. und Posnett, D.N. (1998) Mycoplasma superantigen is a CDR3 dependent ligand for the T-cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* **187**, 319
- Holoshitz, J., Konig, F., Coligan, J. E., de Bruyn, J. und Strober, S. (1989) Isolation of CD4⁻ CD8⁻ mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* **339**, 226-229.
- Housset, D., Mazza, G., Gregoire, C., Piras, C., Mallisen, B. und Fontecilla-Camps, J.C. (1997) *EMBO J.* **16**, 4205-4216
- Hozumi, N., Tonegawa, S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes encoding for variable and constant regions. *PNAS* **73**, 3628-3632
- Hünig, T., Wallny, H.-J., Hartley, J.K., Lawetzky, A. und Tiefenthaler, G. (1989) A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T-cell antigen receptor that induces T-cell activation. *J. Exp. Med.* **169**, 73
- Huston, J.S., McCartney, J., Tai, M-S., Mottola-Hartshorn, C., Jin, D., Warren, F., Keck, P. und Oppermann, H. (1993) Medical applications of singlechain-antibodies. *Int. Rev. Immunol.* **10**, 195
- Ignatowicz, L., Winslow, G., Bill, J., Kappler, J. und Marrack, P. (1995) Cell surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J. Immunol.* **154**, 3852

- Janeway, C. A. (1988) Frontiers of the immune system. *Nature* **333**, 804-806.
- Janeway, C. A., Travers, P. Immunologie. 2 Aufl.; Spektrum Verlag, Heidelberg, 1997.
- Joosten, I., Wauben, M.H.M., Holewijn, M.C., Reske, K., Pedersen, L., Roosenboom, C.F.P., Hensen, E.J., van Eden, W. und Buus, S. (1994) Direct binding of autoimmune disease related T-cell epitopes to purified Lewis rat MHC class II molecules. *Int. Immunol.* **6**, 751
- Jung, S., Toyka, K.V. und Hartung, H.P. (1995) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by antibodies against CD2. *Eur. J. Immunol.* **25**(5), 1391-1398
- Kabelitz, D., Bender, A., Schondelmaier, S., Schoel, B. und Kaufmann, S. H. E. (1990) A large fraction of human peripheral blood γ/δ^+ T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not its 65-kD heat shock protein. *J. Exp. Med.* **171**, 667-679.
- Kampinga, J., Kroese, F.G.M., Pol, G.H., Niewenhuis, P., Haag, F., Singh, P.B., Roser, B. und Aspinall, R. (1989) A monoclonal antibody to a determinant of the rat T-cell antigen receptor expressed by a minor subset of T-cells. *Int. Immunol.* **1**, 289
- Kaufmann, S. H. E. (1996) γ/δ and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2272-2279.
- Kelly, A.P., Monaco, J.J., Cho, S.G. und Townsdales, J. (1991) A new human HLA class II related locus, DM. *Nature* **353**, 571
- Kersten, C. M., McCluskey, R. T., Boyle, L. A. und Kurnick, J. T. (1996) *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* induce expansion of V δ 2 cells in adult peripheral blood, but of V δ 1 cells in cord blood. *J. Immunol.* **157**, 1613-1619.

- Klenerman, P., Cerundolo, V. und Dunbar, P.R. (2002) Tracking T-cells with tetramers: new tales from new tools. *Nature Reviews Immunol.* April 2002 volume 2
- Klein, J. (1975) Biology of the mouse histocompatibility-2 complex. Springer Verlag, New York
- Kozono, H., White, J., Clement, J., Marrack, P. und Kappler J. (1994) Production of soluble MHC class II molecules with covalent bound single peptides. *Nature* **369**, 151
- Kuppers, R.C. und Henney, C.S. (1977) Studies on the mechanism of lymphocyte mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and cytotoxic expression in killer T-cells. *J. Immunol.* **118**, 71-88
- Kurth, D., Neumann, J., Demleitner, K., Hildmann, J., Mehlig, M., Scheicher, C., Wendling, U., Sun, D. und Reske, K. (1997) Full length cDNA of rat RT1.DMa and RT1.DMb and expression of RT1.DM genes in dendritic and langerhans cells. *Biol. Chem.* **378**, 10005
- Lafont, V., Liautard, J., Gross, A., Liautard, J.P. und Favero, J. (2000) Tumor necrosis factor alpha is differently regulated in gamma delta and alpha beta human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 19282-19287
- Lang, F., Peyrat, M. A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vie, H., Fournié, J. J. und Bonneville, M. (1995) Early activation of human V γ 9V δ 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol.* **154**, 5986-5994.
- Lennon-Dumenil, A.-M., Bakker, A.H., Wolf-Bryant, P., Ploegh, H.L. und Lagaudriere-Gesbert, C. (2002) A closer look at proteolysis and MHC class II restricted antigen presentation. *Current Opinion in Immunol.* **14**, 15-21

- Letourneur, F. und Malissen, B. (1989) Derivation of a T-cell hybridoma variant deprived of functional T-cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a non-functional alpha-mRNA of BW5147 origin. *Eur. J. Immunol.* **19**, 2269
- Li, B., Bassiri, H., Rossman, M. D., Kramer, P., Eyuboglu, A. F., Torres, M., Sada, E., Imir, T. und Carding, S. R. (1998) Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human $\gamma\delta$ T cells: a mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* **161**, 1558-1567.
- Li, H., Lebedeva, M. I., Llera, A. S., Fields, B. A., Brenner, M. B. und Mariuzza, R. A. (1998) Structure of the V δ domain of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* **391**, 502-506.
- Li, S.-M., Hennig, S. und Heide, L. (1998) Shikonin: a geranyl diphosphate-derived plant hemiterpenoid formed via the mevalonate pathway. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2721-2724.
- Li, H., Llera, A., Malchiodi, E.L. und Mariuzza, A. (1999) The structural basis of T-cell activation by superantigens. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 435
- de Libero, G., Casorati, G., Giachino, C., Carbonara, C., Migone, N., Matzinger, P. und Lanzavecchia, A. (1991) Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral $\gamma\delta$ T cells. *J. Exp. Med.* **173**, 1311-1322.
- de Libero, G. (1997) Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Today* **18**, 22-26.
- Liblau, R., Tisch, R., Bercovici, N. und McDevitt, H.O. (1997) Systemic antigen in the treatment of T-cell mediated autoimmune diseases. *Immunol. Today* **18(12)**, 599-604
- Lin, J. H. (1996) Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* **18**, 75-85.

- Lindh, J. und Kallen, B. (1978) Genetics of susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis studied in three rat strains. *J. Immunogenet.* **5(5)**, 347-354
- Liu, J.Q., Bai, X.F., Shi, F.D., Xiao, B.G., Li, H.L., Levi, M., Mustafa, M., Wahren, B. und Link, H. (1998) Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by nasal administration of encephalitogenic MBP peptides: synergistic effects of MBP68-88 and 87-99. *Int. Immunol.* **10**, 1139-1148
- Lobel, S.A. und Cramer, D.V. (1981) Demonstration of a new genetic locus in the major histocompatibility system of the rat. *Immunogenetics* **13**, 465
- Locker, J.T., Gill, J.P., Kraus, T.O., Swarop, M., Riviere, M., Islam, M.Q., Levan, G., Szpirer J. und Szpirer C. (1990) The rat MHC and cystathione beta synthetase gene are syntenic on chromosome 20. *Immunogenetics* **31**, 271
- Mage, M.G., Lee, L., Ribaldo, R., Corr, M., Kozlowski, S., Mc Hugh, L. und Margulies, D.H. (1992) A recombinant, soluble single chain class I major histocompatibility complex molecule with biological activity. *PNAS* **89**, 10658
- Mason, D.W., Arthur, R.P., Dallmann, M.J., Green, J.R., Spoickett, G.P. und Thomas, M.L. (1983) Functions of rat T-lymphocyte subsets isolated by means of monoclonal antibodies. *Immunol. Reviews* **74**, 57
- McMahan, R.H., Watson, L., Meza-Romero, R., Burrows, G.G., Bourdette, D.N. und Buenafe, A.C. (2003) Production, Characterization, and Immunogenicity of a soluble rat single chain T cell receptor specific for an encephalitogenic peptide. *J.Biol.Chem.* **Vol.278**, 30961-30970
- McMaster, W.R. und Williams, A.F. (1979) Identification of Ia glycoprotein in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur. J. Immunol.* **9**, 426

- McMichael, A. und Kelleher, A. (1990) The arrival of HLA class II tetramers. *J. Clin. Invest.* **104**, 1669-1670.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. und Taniguchi, T. (1993) The IL-2 receptor complex: its structure, function and target genes. *Annu.Rev. Immunol.* **11**, 245-267
- Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E. und Brenner, M. B. (1995) Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Immunity* **3**, 495-507.
- Morita, C. T., Tanaka, Y., Bloom, B. R. und Brenner, M. B. (1996) Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells. *Res. Immunol.* **147**, 347-353.
- Munk, M. E., Gatrill, A. J. und Kaufmann, S. H. E. (1990) Target cell lysis and IL-2 secretion by $\gamma\delta$ T lymphocytes after activation with bacteria. *J. Immunol.* **145**, 2434-2439.
- Munk, M. E., Elser, C. und Kaufmann, S. H. E. (1996) Human $\gamma\delta$ T-cell response to *Listeria monocytogenes* protein components *in vitro*. *Immunol.* **87**, 230-235.
- Ohashi, P.S. et al. (1985) Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature* **316**, 606-609
- Ojcius, D., Godeau, F., Abastado, J.-P., Casanova, J.L. und Kourilsky, P. (1993) Real time measurement of antigenic peptide binding to empty and preloaded single-chain MHC class I molecules. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1118
- Ollson, T. (1995) Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* **45** (Suppl.6) S11-5
- Owen, B.A. und Pease, L.R. (1999) TAP association influences the conformation of nascent MHC class I molecules. *J. Immunol.* **162**, 4677

- Pamer, E. und Cresswell, P. (1998) Mechanisms of the MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 323-358.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. und Baltimore, D. (1993). Produktion of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:8392
- Pechhold, K., Wesch, D., Schondelmaier, S. und Kabelitz, D. (1994) Primary activation of V γ 9-expression $\gamma\delta$ T cells by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **152**, 4984-4992.
- Pfeffer, K., Schoel, B., Plesnila, N., Lipford, G. B., Kromer, S., Deusch, K. und Wagner, H. (1992) A lectin-binding, protease-resistant mycobacterial ligand specifically activates V γ 9⁺ human T cells. *J. Immunol.* **148**, 575-583.
- Pichyangkul, S., Saengkrai, P., Yongvanitchit, K., Stewart, A. und Heppner, D. G. (1997) Activation of $\gamma\delta$ T cells in malaria: Interaction of cytokines and a schizont-associated *Plasmodium falsiparum* antigen. *J. Infect. Dis.* **176**, 233-241.
- Poccia, F., Cipriani, B., Vendetti, S., Colizzi, V., Poquet, Y., Battistini, L., Lopez-Botert, M., Fournié, J.-J. und Gougeon, M.-L. (1997a) CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V γ 9V δ 2 T lymphocytes. *J. Immunol.* **159**, 6009-6017.
- Poccia, F., Malkovsky, M., Gougeon, M. L., Bonneville, M., Lopez-Botet, M., Fournié, J. J. und Colizzi, V. (1997b) $\gamma\delta$ T cell activation or anergy during infections: the role of non-peptide TCR ligands and HLA class I molecules. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 287-291.
- Poccia, F., Wallace, M., Colizzi, V. und Malkovsky, M. (1998) Possible protective and pathogenic roles of $\gamma\delta$ T lymphocytes in HIV-infections (review). *Int. J. Mol. Med.* **1**, 409-413.

- Poquet, Y., Constant, P., Halary, F., Peyrat, M.-A., Gilleron, M., Davodeau, F., Bonneville, M. und Fournié, J.-J. (1996) A novel nucleotide-containing antigen for human blood $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2344-2349.
- Poquet, Y., Kroca, M., Halary, F., Stenmark, S., Peyrat, M.-A., Bonneville, M., Fournié, J. J. und Sjöstedt, A. (1998) Expansion of V γ 9V δ 2 T cells is triggered by *Francisella tularensis*-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination. *Infect. Immun.* **66**, 2107-2114.
- Porcelli, S., Brenner, M. B. und Band, H. (1991). Biology of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Immunological Reviews* **120**:137
- Pulvertaft, R.T. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* **1**, 238-240
- Racke, M.K., Critchfield, J.M., Quigley, L., Cannella, B., Raine, C.S., McFarland, H.F. und Lenardo, M.J. (1996) Intravenous antigen administration as a therapy for autoimmune demyelinating disease. *Ann. Neurol.* **39**, 46-56
- Ralph et al., (1976) Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.* **143**, 1528-1533
- Raine, C.S., Mokhtarian, F. und McFarlin, D.E. (1984) Adoptively transferred chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. Neuropathologic analysis. *Lab Invest.* **51**, 534-546
- Reinherz, E.L., Tan, K., Tang, L., Kern, P., Liu, J., Xiong, Y., Hussey, R.E., Smolyar, A., Hare, B. und Zhang, R. et al. The crystal structure of a T-cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* **286**, 1913-1921
- Reiser, J.B., Darnault, C., Guimezanes, A., Gregoire, C., Mosser, T. et al. (2000) Crystal structure of a T-cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat. Immunol.* **2000**, 291-297

- Rhode, P.R., Burkhardt, M., Jin-an-Jiao, Siddiqui, A.H., Huang, G.P. und Wong, H.C. (1996) Single chain MHC class II molecules induce T-cell activation and apoptosis. *J. Immunol.* **157**, 4885
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R. Villadangos, J.A., Ploegh, H.L. und Chapman, H.A. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357
- Robinson, P.J., Lundin, L., Sege, K., Graf, L., Peterson, H. und Wigzell P.A. (1981) Location of mouse β_2 -microglobulin genes β_2m determined by linkage analysis. *Immunogenetics* **14**, 449
- Roche, P.A., Marks, M.S. und Cresswell, P. (1994) Formation of a nine subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**, 392
- Sackstein, R. und Colten H.R. (1984) Molecular regulation of MHC class III (C4 and factor B) gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **133**, 1618
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. und Mackay, C. R. (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* **19**, 568-574.
- Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrlich, E. W., Davies, M. M., Bluestone, J. A., Matis, L., Draper, R. K. und Chien, Y. (1994) The nature of major histocompatibility complex recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Cell* **76**, 29-37.
- Schoel, B., Sprenger, S. und Kaufmann, S. H. E. (1994) Phosphate is essential for stimulation of V γ 9V δ 2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand. *Eur. J. Immunol.* **24**, 1886-1892.
- Schoel, B. und Kaufmann, S. H. E. (1998) Influence of mycobacterial virulence and culture condition on $\gamma\delta$ T cell activation. *Microbial Pathogen.* **24**, 197-201.

- Segal, B.M., Dwyer, B.K. und Shevach, E.M. (1998) An interleukin (IL)-10/IL-12 immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **187**, 537-546
- Sharp, A.H. und Freeman, G.J. (2002) The B7-CD28 Superfamily. *Nature Reviews* Volume 2 116-126
- Shen, J., Andrews, D. M., Pandolfi, F., Boyle, L. A., Kersten, C. M., Blatman, R. N. und Kurnick, J. T. (1998) Oligoclonality of V δ 1 and V δ 2 cells in human peripheral blood mononuclear cells: TCR selection is not altered by stimulation with gram-negative bacteria. *J. Immunol.* **160**, 3048-3055.
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G. und Rock, K.L. (1997) Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* **158**, 2723
- Shinohara, N. und Sachs, D.H. (1981) Evidence for homologues of the murine I-A and I-E loci in the rat MHC. *J. Immunol.* **126**, 934
- Silvers, W.K., Wilson, D.B. und Palm, J. (1967) Mixed leucocyte reactions and histocompatibility in rats. *Science* **155**, 703
- Smeltz, R.B., Wauben, M.H.M., Wolf, N.A. und Swanborg, R.H. (1999) Critical requirement for aspartic acid at position 82 of myelin basic protein 73-86 for recruitment of V β 8.2⁺ T-cells and encephalitogenicity in the Lewis rat. *J. Immunol.* **162**, 829-836
- Schmidt, W., Buschle, M., Zauner, W., Kirlappos, H., Mechtler, K., Trska, B. und Birnstiel, M.L. (1997) Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines. *PNAS* **94**(7), 3262-3267
- Strominger, J.L. (1985) The human major histocompatibility complex. Genes and proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **458**, 262

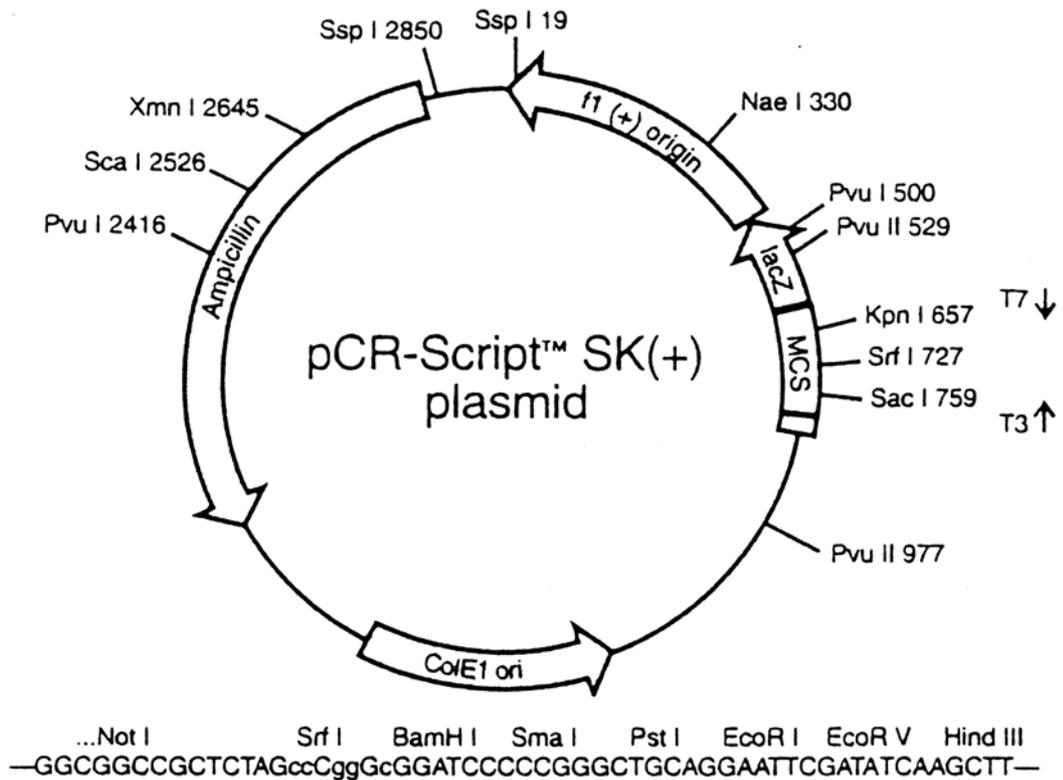
- Steinmetz, M.A., Winoto, K., Minard, K. und Hood, L. (1982) Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* **28**, 489
- Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L. und Wiley, D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**, 215
- Stout, R. und Bottomly, K. (1989) Antigen specific activation of effector macrophages by interferon γ producing (Th1) T-cell clones: failure of IL-4 producing (Th2) T-cell clones to activate effector functions in macrophages. *J.Immunol.* **142**, 760
- Sundberg, E.J., Li, Y. und Mariuzza, R.A. (2002) So many ways of getting in the way: diversity in the molecular architecture of superantigen-dependent T-cell signalling complexes. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 36-44
- Swanborg, R.H. (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **77**, 4-13
- Syha, J., Henkes, W. und Reske, K. (1989) Complete cDNA sequence coding for the MHC class II RT1.B alpha chain of the Lewis rat. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3985
- Syha-Jedelhauser, J., Wendling, U., und Reske, K. (1991) Complete coding nucleotide sequence of cDNA for the class II RT1.B beta chain I chain of the Lewis rat. *Biochem. Biophys. Acta* **1089**, 414
- Takahashi, I. und Kiyono, H. (1998) $\gamma\delta$ T Cells: Bodyguards and/or sleepers in the gut. *Mucosal T Cells* **71**, 77-87.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H. und Seto, H. (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9879-9884.

- Tanaka, Y., Sano, S., Nieves, E., de Libero, G., Rosa, D., Modlin, R. L., Brenner, M. B., Bloom, B. R. und Morita, C. T. (1994) Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8175-8179.
- Tanaka, Y., Morita, C. T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B. und Bloom, B. R. (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **375**, 155-158.
- Torres-Nagel, N.E., Gold, D.P. und Hünig, T. (1993) Identification of rat TCR V β 8.2, 8.5 and 10 gene products by monoclonal antibodies. *Immunogenetics* **37**, 304
- van Tienhoven, E.A., ten Brink, C.T., van Bergen, C.T., Koning, F., van Eden, W. und Broeren, C.P.M. (2001) Induction of antigen specific CD4⁺ T-cell responses by invariant chain based DNA vaccines. *Vaccine* **19**, 1515
- Wandstrat, A. und Wakeland, E. (2002) The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nature Immunol.* **Volume 2** No. 9
- Wauben, M.H.M., Manou van de Kraan, Grosfeld-Stulemeyer, M.C. und Joosten, I. (1997) Definition of an extended binding motif for the autoimmune disease associated Lewis rat RT1.B^l molecule. *Int. Immunol.* **2**, 281-290
- Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J., Hood, L. (1978) Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* **276**, 785-790
- Weishaupt, A., Gold, R., Gaupp, S., Giegerich, G., Hartung, H.P. und Toyka, K.V. (1997) Antigen therapy eliminates T-cell inflammation by apoptosis: effective treatment of experimental autoimmune neuritis with recombinant myelin protein P2. *PNAS* **94(4)**, 1338-1343

- Weishaupt, A., Jander, S., Bruck, W., Kuhlmann, T., Stienekemeier, M., Hartung, T., Toyka, K.V., Stoll, G. und Gold, R. (2000) Molecular mechanisms of high-dose antigen therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis: rapid induction of Th1-type cytokines and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* **165**, 7157-7163
- Wekerle, H. (1993) Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3**, 779-784
- Wesch, D., Kabelitz, D., Friese, K. und Pechhold, K. (1996) Mycobacteria-reactive $\gamma\delta$ T cells in HIV-infected individuals: lack of V γ 9 cell responsiveness is due to antigen-specific CD4 helper type 1 cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 557-562.
- Wesch, D., Marx, S. und Kabelitz, D. (1997) Comparative analysis of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur. J. Immunol.* **27**, 952-956.
- Wesch, D., Hinz, T. und Kabelitz, D. (1998) Analysis of the TCR V γ repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals. *Int. Immunol.* **10**, 1067-1075.
- White, J., Blackman, M., Bill, J., Kappler, J., Marrack, P., Gold, D.P. und Born, W. (1989) Two better cell lines for making hybridomas expressing specific T-cell receptors. *J. Immunol.* **142**, 1027
- Wilhelm, M. und Tony, H.-P. (1994) An *in vitro* model for the expansion of V γ 9V δ 2 T lymphocytes during development. *Scand. J. Immunol.* **40**, 521-528.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowen, W.B. und Ramshaw, I.A. (1996) IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **157**, 3223-7
- Wilson, I.A. (1999) Class-conscious TCR? *Science* **286**, 18767-1868

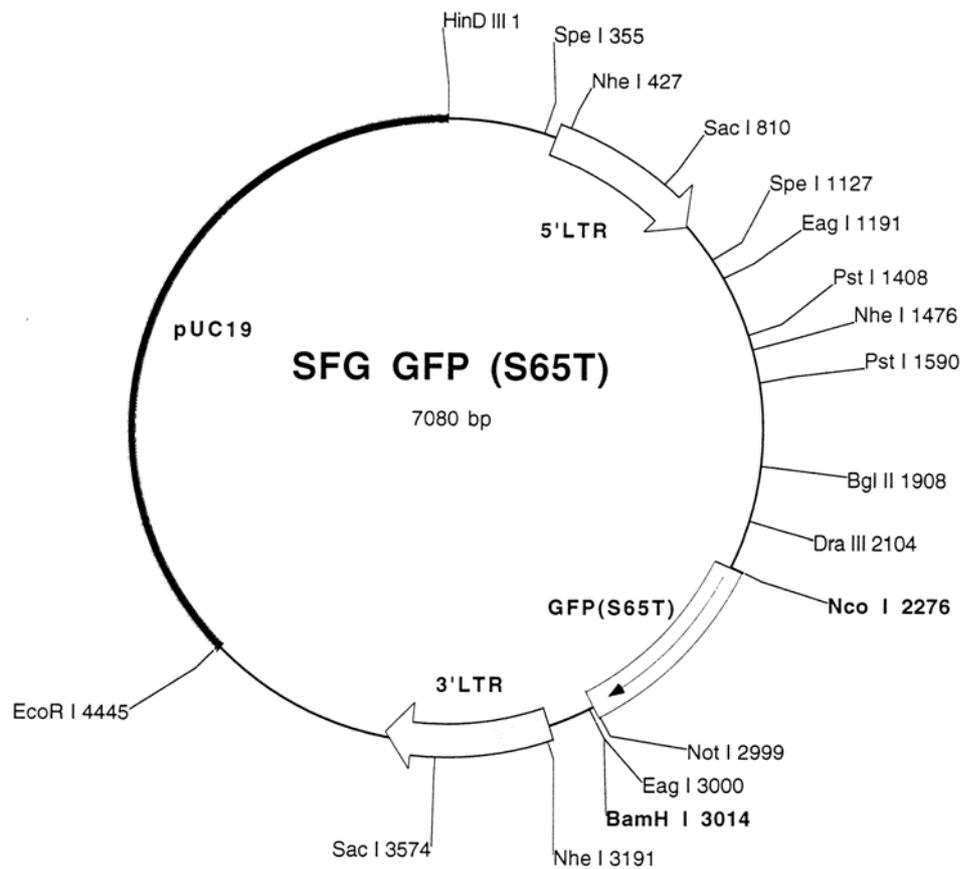
- Yamamoto, K., Floyd Smith, G., Francke, U., Koch, N., Lauer, W., Dobberstein, B., Schafer, R. und Hämmerling, G.J. (1985) The gene encoding the Ia-associated invariant chain is located on chromosome 18 in the mouse. *Immunogenetics* **21**, 83
- Zamvil, S.S. und Steinman, L. (1990) The T-lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 579-621
- Zettl, U.K., Gold, R., Toyka, K.V. und Hartung, H.P. (1995) Intravenous glucocorticosteroid treatment augments apoptosis of inflammatory T-cells in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54(4)**, 540-547
- Zhang, X.M., und Heber-Katz, E. (1992) T-cell receptor sequences from encephalitogenic T-cells in adult Lewis rats suggest an early ontogenic origin. *J. Immunol.* **148**, 746
- Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C. (1979) MHC restricted cytotoxic T-cells: Studies on biological role of polymorphic major transplantation antigens during T-cell restricted specificity, function and responsiveness. *Adv. Immunol.* **27**, 52

9. Vektorkarten



Vektorkarte des Subklonierungsvektor pCR2.1 von Invitrogen

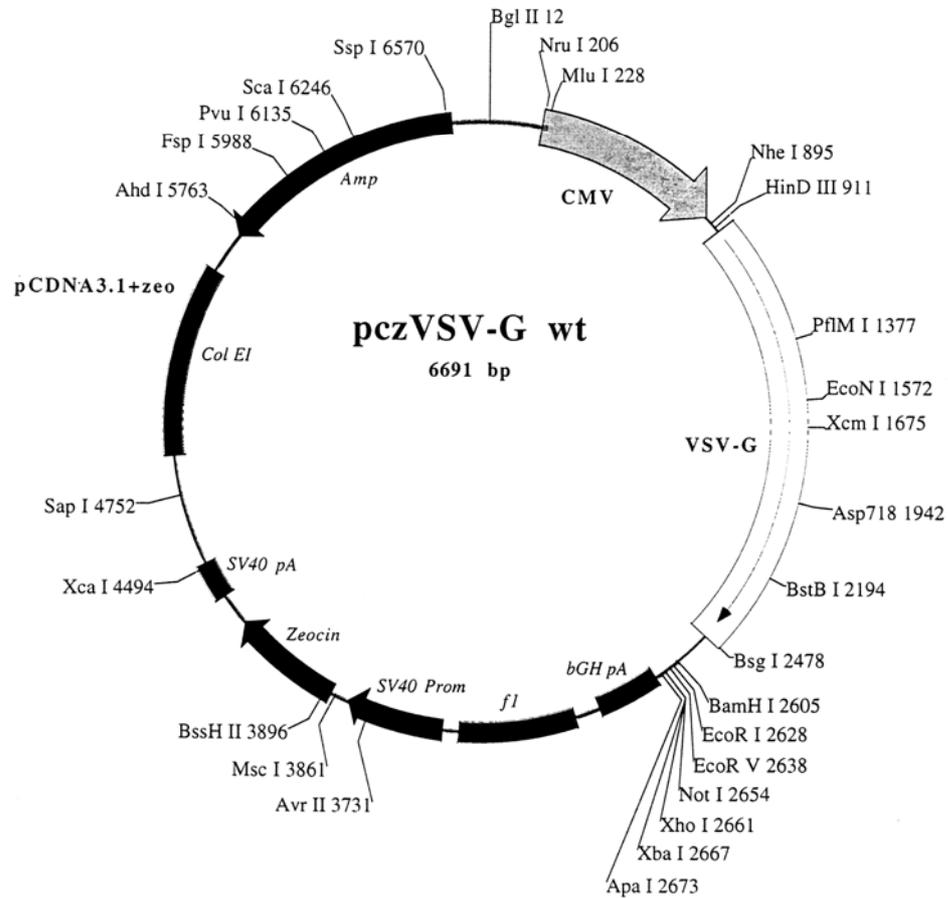
Der Vektor liegt linearisiert mit jeweils einem Adeninüberhang vor. Kovalent an das Adenin wurde eine Topoisomerase gekoppelt, welche durch ihr Ablösen das mit Thymin überhängende PCR Produkt direkt in den Vektor ligiert.



Vektorkarte des retroviralen Expressionsvektors SFG-GFP-S65T

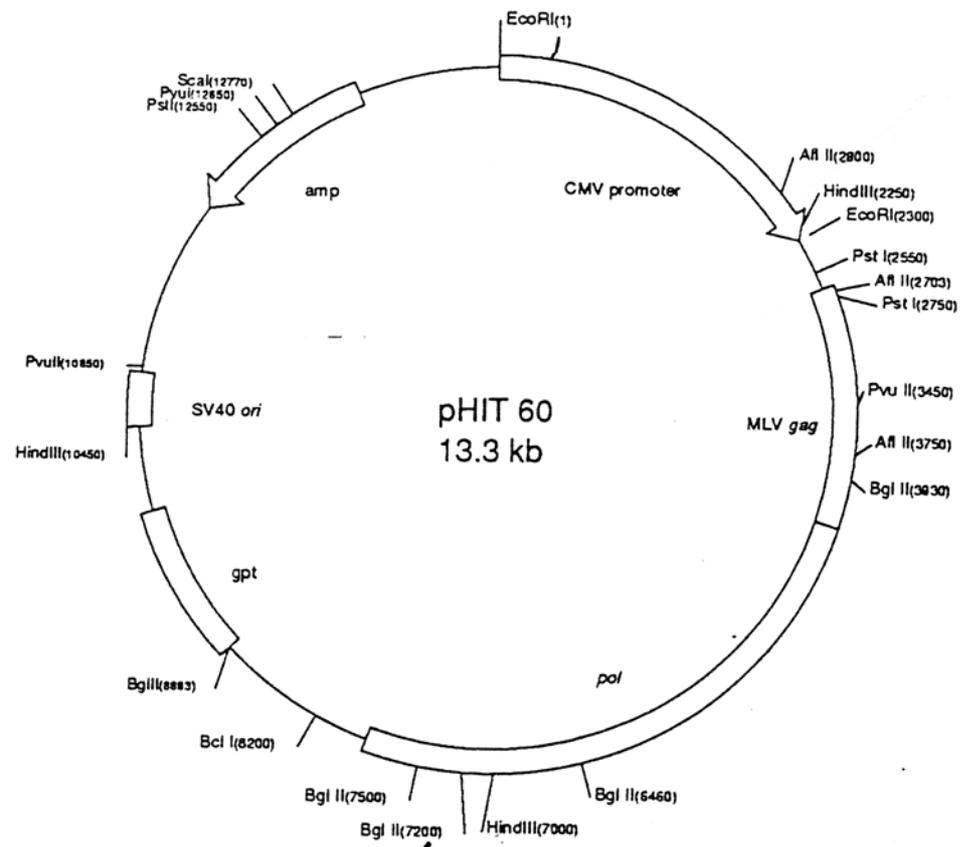
Der retrovirale Expressionsvektor SFG-GFP-S65T enthält zwischen der NcoI- und der BamHI-Schnittstelle ein 738bp großes Fragment des „grün fluoreszierenden Proteins“ GFP. Dieses Gen wurde jeweils durch die α - und durch die β -Kette des RT1B¹ Moleküls ersetzt.

(Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dirk Lindemann)



Vektorkarte des *env*-Gen tragenden Vektors pcz VSV-G wt

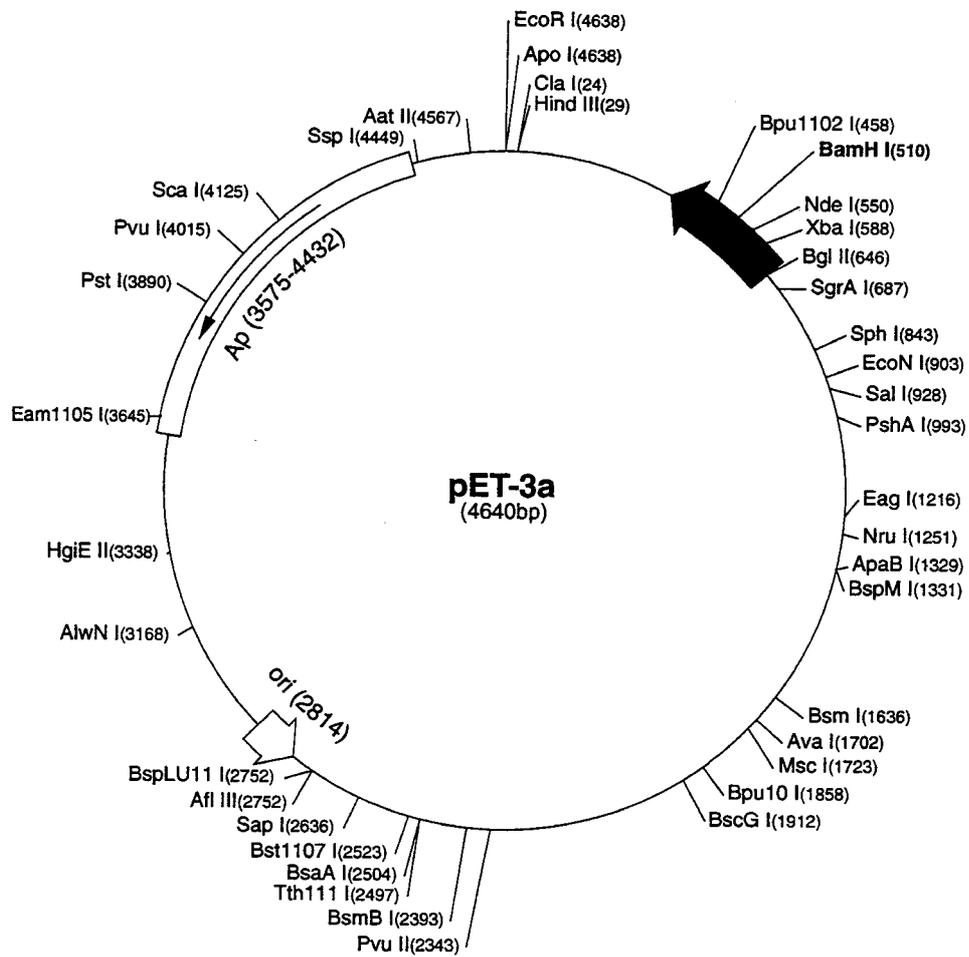
Der Vektor pcz VSV-G wt enthält das für die Virusproduktion notwendige Gen *env* aus dem Vesicular Stomatitis Virus, das für Hüllproteine kodiert. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dirk Lindemann)



Vektorkarte des *gag*- und *pol*-Gen tragenden Vektors pHIT 60

Der Vektor pHIT 60 enthält die zur Virusvermehrung notwendigen Gene *gag* und *pol* des Moloney Mouse Leukemia Virus (MoMLCV), die für gruppenspezifisches Antigen und Polymerase kodieren.

(Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Dirk Lindemann).



Vektorkarte des Proteinexpressionsvektors pET-3a

Proteinexpressionsvektor, bei dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors liegt.
Novagen, Madison

10. Abkürzungen

aa	Aminosäuren
Ag	Antigen
BCR	B-Zellrezeptor
BIO	Biotin
bp	Basenpaare
BSS	<i>balanced salt solution</i>
cDNA	(zu mRNA) komplementäre DNA
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
D α Mig	polyklonales Eselserum gegen Maus Immun-globulin (donkey <i>anti mouse Ig</i> “)
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellscanner (-sorter)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde

HV	hypervariable Region
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KD	kilo Dalton
LEW	Lewis (-Ratte)
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	Myelin basisches Protein
MHC	<i>major hisocompatibility complex</i>
min	Minute
M	molar
MAS	<i>Mycoplasma arthritidis</i> Superantigen
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
mRNA	Boten-RNA
NMIg	normales Mausimmunglobulin

on	<i>over night</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	R-Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
R α MIg	polyklonales Kaninchenserum gegen Maus Immunglobulin („ <i>rabbit anti mouse Ig</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>revolutions per min.</i> “)
s	Sekunde
Sag	Superantigen
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Toxin B
SEC1	<i>Staphylococcus aureus</i> Toxin C1
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
Upm	Umdrehungen pro Minute
TCR	T-Zellrezeptor

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TNF Tumornekrosefaktor

U *units*

LEBENS LAUF:

Persönliche Daten:

Name und Vorname: Kreiß, Matthias

Geburtsdatum und -ort: 16. 09. 1972 in Würzburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Familienstand: ledig

Eltern: Kreiß, Egbert
Erster Direktor der Landesversicherungsanstalt (LVA)
Unterfranken a.D.
Kreiß, Elfriede; geb. Köderitz

Geschwister: Kreiß, Christian
Dr. Kreiß, Andreas

Aktuelle Position: International Regulatory Affairs Manager bei der
HEXAL AG (CMC/Salutas Pharma) in Barleben

Kontakt: Franz-Stadelmayer Str.6
97074 Würzburg
Deutschland
Tel. +49931/82424
mobil: 0171/8282686
e-mail: matthias_kreiss@yahoo.de

Ausbildung:

09. 79 - 07. 83 Grundschohle Mönchberg in Würzburg

09. 83 - 06. 92 Sieboldgymnasium in Würzburg

06. 92

Allgemeine Hochschulreife

10. 92 - 10. 93 12monatiger Wehrdienst an der Saaleck-Kaserne Hammelburg und
Balthasar-Neumann-Kaserne Veitshöchheim

11. 93 - 07. 98

Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität in Würzburg.
Diplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie,
Zell-und Entwicklungsbiologie und Biochemie
Thema der Diplomarbeit: "Gentransfer und funktionelle Charakterisierung
eines humanen γ/δ T-Zellrezeptors mit Spezifität für mikrobielle
Phospholiganden"

07. 98

Diplom

08. 98 – 12. 03

Promotion am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität
Würzburg mit dem Thema: "T-Zellrezeptorbindung und Modulation der T-
Zellaktivierung durch Autoantigene der Ratte"

Zusatzqualifikationen und Engagements:

08. 88 – 08. 90 mehrfache Tätigkeit als Werkstudent bei der Siemens AG und Coca-Cola GmbH in Würzburg
08. 99 – 12. 99 Mitentwicklung und Produktion des Soundtracks und Trailers für das Multiplexkino „Cineworld“ im Mainfrankenpark bei Würzburg
11. 99 – 06. 03 Studiengang "Betriebswirtschaft für Führungskräfte" für Akademiker an der privaten Wirtschaftsakademie AFW Bad Harzburg mit Schwerpunkt Projektmanagement. Diplomnote 1.0
02. 04 – 04. 04 Mitorganisation des 1. int. Meetings für Drug Regulatory Affairs und Change Control (IMDRACC) der HEXAL AG (Salutas Pharma GmbH) in Magdeburg und Berlin

Mitgliedschaft in Fachgesellschaften:

- seit 1998 Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
seit 2001 Robert-Koch-Gesellschaft

EDV-Kenntnisse:

IBM und Apple Macintosh Software: Word, Excel, Clarisdraw, Versaterm, Powerpoint, Outlook und andere Officeprogramme

Sprachkenntnisse:

- Deutsch: Muttersprache
Englisch: sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Französisch: Grundlagenkenntnisse
Spanisch: Grundlagenkenntnisse
Latein: großes Latinum

Hobbies:

Alpinismus, Musik, Musikproduktion, Motorsport, Film und Sport

Würzburg, 11.5. 2004

.....
Matthias Kreiß

PUBLIKATIONEN:

Contrasting contributions of complementary-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

M.Kreiß, A. Asmuß, K. Krejci, D. Lindemann, T. Myoshi-Akiyama, T. Uchiyama, L. Link, C.P.M. Broeren,
and T.Herrmann

Int. Immunology, Vol. 16, No. 5, pp. 655-663

Differential Effect of Acute and Permanent Heat Shock Protein 70 Overexpression in Tumor Cells on Lysability by Cytotoxic T Lymphocytes

R.Dressel, C. Grzeszik, M. Kreiss, D. Lindemann, T. Herrmann, L. Walter and E. Günther

Cancer Research 63, 8212-8220, December 1, 2003

Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by administration of cells expressing antigenic peptide covalently linked to MHC class II

A. Weishaupt, M. Kreiss, R. Gold, T. Herrmann

Journal of Neuroimmunology, 2004, in press

Changes in the CDR2 and the hypervariable region 4 (HV4/CDR4) of BV8S2 (V β 8.2) TCR β -chain affect differentially recognition of MBP peptide 68-88 and the bacterial superantigens SEC1, MAS and YPM

M.Kreiß, A. Asmuß, K. Krejci, L. Link, T. Myoshi-Akiyama, T. Uchiyama, C.P.M. Broeren,
D. Lindemann and T.Herrmann

Immunobiology, Volume 205, September 2002

Residue V38 of MHC class II α -chains: Negative effects of the substitution V38M on surface expression and antigen binding can be rescued by enforced peptide binding

M. Kreiß and T. Herrmann

Immunobiology, Volume 204, September 2001

Revised sequence of the RT1B^I α -chain and functional expression of RT1B^I

M. Kreiß, D. Lindemann, K. Hoffmann, C.P.M. Broeren and T. Herrmann

Immunobiology, Volume 203, November 2000

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

Gutachter:.....Prof. Dr. T. Herrmann

Gutachter:.....Prof. Dr. J. Hacker

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....