

Klonierung und Charakterisierung
eines polymorphen MHC Kl. I-
Moleküls der LEW.1F-Ratte, das
präferentiell V α 8.2-exprimierende
CD8-T-Zellen expandiert.

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
BEATRIX MEHLING
aus Garmisch-Partenkirchen

Würzburg
2. April 2000

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, den 2. April 2000

(Beatrix Mehling)

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Göbel
Gutachter: Prof. Dr. Thomas Hünig
Prof. Dr. Martin Heisenberg

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Der Aufbau des Immunsystems.	7
1.2	MHC	9
1.2.1	MHC-Gene: Locus und Polymorphismus.	9
1.2.2	Die dreidimensionale Struktur der MHC-Proteine.	14
1.2.3	Beladung der MHC-Proteine mit Peptid.	18
1.3	TCR	20
1.3.1	Gensegmentanordnung und Rekombination.	20
1.3.2	TCR-Struktur	22
1.4	TCR/pMHC-Interaktion	22
1.4.1	TCR/pMHC-Bindung	22
1.4.2	Änderung der Strukturen von pMHC und TCR bei Bindung.	27
1.4.3	Besonderheit der TCR/pMHC-Interaktion.	28
1.4.4	Folgen der TCR/pMHC-Interaktion.	28
1.4.4.1	TCR/pMHC-Interaktion in der TC-Entwicklung.	29
1.4.4.2	TCR/pMHC-Interaktionen der reifen T-Zelle.	30
1.4.4.3	Alloreaktion	31
1.5	Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit.	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Material	34
2.1.1	Reagenten	34
2.1.1.1	Chemikalien	34
2.1.1.2	Puffer und Lösungen	35
2.1.1.3	Serologische Reagenten	39
2.1.1.4	Enzyme	41
2.1.2	Vektoren	41
2.1.3	Oligonukleotide	42
2.1.4	Peptide	43
2.1.5	Bakterien	44
2.1.6	Zelllinien und Hybridome	44

2.1.7	Versuchstiere	45
2.1.8	Programme	45
2.1.9	Kits	45
2.1.10	Geräte	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.1.1	RNA-Isolierung	47
2.2.1.2	cDNA-Synthese	47
2.2.1.3	Gelelektrophorese	48
2.2.1.4	Restriktionsspaltung	48
2.2.1.5	Elution	48
2.2.1.6	PCR	48
2.2.1.7	Phenolisierung	49
2.2.1.8	Transformation	49
2.2.1.9	Ligation	49
2.2.1.10	Plasmidpräparation	49
2.2.2	Immunologische Methoden	50
2.2.2.1	Herstellung von ConA-Blasten.	50
2.2.2.2	Durchflußzytometrische Analyse	50
2.2.2.3	Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR)	50
2.2.2.4	Mitomycin C-Inaktivierung	51
2.2.2.5	Zytotoxischer Test	51
2.2.2.6	„Panning“	52
2.2.2.7	„Sortieren“ von V α 8.2-Zellen.	53
2.2.2.8	Reinigung von T-Zellen.	53
2.2.2.9	Reinigung von CD8 ⁺ -T-Zellen durch eine Säule.	54
2.2.2.10	TAC-Lyse zur Entfernung von Erythrozyten.	54
2.2.2.11	RMA-S-Peptidstabilisierungstest.	54
2.2.3	Zellbiologische Methoden	54
2.2.3.1	Zellkultur	54
2.2.3.2	Transfektion von L-Zellen mit CaCl ₂	55
2.2.3.3	Transiente Transfektion mit Chloroquin	55
2.2.3.4	Elektroporation	56
2.2.3.5	Retrovirale Infektion	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Bevorzugte Interaktion von V α 8.2-CD8-Zellen mit RT1 ^f	58
3.2	Klonierung eines MHC-Ia-Moleküls der LEW.1F-Ratte.	61
3.2.1	Klonierungsstrategie.	61
3.2.2	Sequenz des klonierten Gens.	66
3.2.3	Umklonierung in einen retroviralen Vektor.	69

3.3	Charakterisierung des RT1.A ^f -Moleküls.	70
3.3.1	Typisierung des A ^f -Moleküls durch Alloantikörper.	70
3.3.2	Erkennung des A ^f -Moleküls durch alloreaktive T-Zellen.	72
3.3.3	Peptidbindung des A ^f -Moleküls.	77
3.4	Das MHC Kl. Ia-Molekül der SD-Ratte.	80
3.5	Präferentielle Interaktion von V α 8.2-CD8-T-Zellen mit A ^f	82
3.5.1	Generierung polyklonaler A ^f -spezifischer CTLs mittels „Panning“.	83
3.5.2	Generierung alloreaktiver A ^f -spezifischer CTLs mittels MLR.	84
3.5.3	Präferentielle Expansion von V α 8.2-CD8-T-Zellen bei Sti- mulierung mit A ^f -exprimierenden Zelllinien.	84
3.6	Kartierung der A ^f /V α 8.2-Interaktion.	93
3.6.1	Das A ^a -Molekül.	93
3.6.2	Klonierung von Hybriden aus A ^a und A ^f	96
3.6.3	Serologische Charakterisierung der Hybridmoleküle.	98
3.6.4	Differentielle Erkennung der Hybridmoleküle durch f-reaktive T-Zellen.	99
3.6.5	Die Interaktion von V α 8.2-CD8-T-Zellen mit den Hybrid- molekülen.	99
4	Diskussion	105
4.1	Charakterisierung von A ^f und A2 ^f	106
4.2	Die präferentielle Interaktion.	114
4.3	Kartierung der A ^f /AV8S2-Interaktion.	118
4.4	Die Bedeutung antigener Peptide bei der A ^f -Erkennung.	124
5	Zusammenfassung	129
	Summary	131
	Literaturverzeichnis	135
	Abkürzungsverzeichnis	147
	Lebenslauf	149
	Publikationsliste	150

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Der Aufbau des Immunsystems.

Die Funktion des Immunsystems ist es, den Körper vor eingedrungenen Pathogenen zu schützen, die ihm schaden oder ihn sogar vernichten könnten.

Das Immunsystem der Vertebraten besteht gleichsam aus zwei Ästen, die stark verflochten und voneinander abhängig sind: dem angeborenen (nativen) und dem erworbenen (adaptiven, antizipatorischen) Teil des Immunsystems.

Der evolutionär ältere Ast, das angeborene Immunsystem, kann sofort, schon beim Eindringen von Krankheitserregern, reagieren. Das tut es u.a. mit Hilfe vorgeformter Rezeptoren, die unveränderliche Merkmale erkennen, wie z.B. LPS (bei Gram-negativen Bakterien), Lipoteichonsäure (bei Gram-positiven) oder doppelsträngige RNA (bei einigen Viren). Komponenten dieses Astes sind u.a. Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen, Proteine der Komplementkaskade, Akute Phase Proteine und Interferone.

Das native Immunsystem bildet damit die erste Verteidigungslinie. Zusätzlich aktiviert es den effektiveren, evolutionär jüngeren Teil des Immunsystems, den adaptiven Ast.

Letzterer zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Erkennung neuer Pathogene aus, für die es keine Möglichkeit der evolutionären Anpassung des Wirtes gibt, da die infektiösen Organismen bei weitem schneller evolvieren als ihr Wirt. Hauptcharakteristika des adaptiven Astes sind die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses und die klonale Selektion.

Die Rezeptoren des adaptiven Astes werden erst während der Entwicklung eines Lymphozyten im Laufe der somatischen Rekombination aus Segmentblöcken zusammengesetzt. Ein Rezeptor entsteht aus zufällig ausgewählten Elementen – eines aus jedem Block –, die somatisch rearrangiert werden. In Verbindung mit weiteren Diversifikationsmechanismen entsteht eine riesige Anzahl an Möglich-

keiten, verschiedene Rezeptoren zu generieren (10^{16}), die ein einzelnes Individuum gar nicht ausschöpfen kann (ein Mensch hat ca. 10^{12} Lymphozyten). In diesem Ast gibt es also keine vorgegebenen Rezeptoren, sondern sie werden während der Lymphozytenentstehung aus Segmenten zusammengesetzt, so daß letztlich jeder Lymphozyt einen anderen Rezeptor trägt.

Durch diese zufällige Generierung von Rezeptoren wird allerdings auch ein Problem aufgeworfen: Die neuentstandenen Rezeptoren können autoreaktiv sein, also körpereigen statt körperfremd erkennen und dem Individuum dadurch schaden. Diese Gefahr wird eingeschränkt, indem die Lymphozyten einen Selektionsprozess durchlaufen, in dem u.a. die selbstreaktiven Zellen eliminiert werden (s. Kapitel 1.4.4.1).

Im Laufe einer Infektion werden hauptsächlich die Lymphozyten aktiviert, die Komponenten des Pathogens erkennen. Diese Zellen proliferieren und beginnen den Körper zu verteidigen. Das ist das Prinzip der klonalen Selektion bzw. Expansion.

Die ausführenden Zelltypen des adaptiven Astes des Immunsystems sind v.a. die T- (für Thymus) und B (engl. bone marrow, für Knochenmark)-Lymphozyten, die B- bzw. T-Zellrezeptoren (BCR/TCR) tragen.

Die Funktion der B-Zellen ist es, die in den Körperflüssigkeiten vorkommenden Pathogene zu bekämpfen. Die BCRs werden dazu in riesiger Menge als lösliche Immunglobuline (sIg, auch als Antikörper (Ak) bezeichnet) in das Blut abgegeben. Dort heften sie sich an die Pathogene und markieren sie so für die Zerstörung durch andere Elemente des Immunsystems (z.B. durch Phagozyten und Komplement).

T-Zellen (TC) erkennen Antigene zellvermittelt, also nur, wenn sie ihnen in prozessierter Form auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Das geschieht mit Hilfe von Adaptormolekülen, den MHC-Proteinen (Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex), die den T-Zellen Proteinabbauprodukte präsentieren.

Die $\alpha\beta$ T-Zellen ($\gamma\delta$ T-Zellen sind für diese Arbeit von untergeordneter Bedeutung und sollen hier nicht näher erläutert werden) können grob in zwei Gruppen untergliedert werden, in zytotoxische (Tc) und Helfer-T-Zellen (Th).

Die Funktion der zytotoxischen T-Zellen ist es, die Integrität normaler Körperzellen zu überwachen. Sie registrieren einen Virusbefall, eine Infektion durch intrazelluläre Mikroorganismen oder auch eine tumorogene Entartung und eliminieren betroffene Zellen. Dafür interagieren sie mittels TCR und dem CD8-Korezeptor mit MHC Kl. I-Molekülen. MHC Kl. I-Proteine müssen daher auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert sein. Kl. I-Moleküle sind mit Peptiden besetzt, deren Proteinvorläufer aus dem Zytosol stammen. Dadurch gewähren sie den T-Zellen gleichsam einen Blick in das Zellinnere, wodurch diese die Körperzellen begutachten können.

Helfer-T-Zellen sind die Koordinatoren des Immunsystems. Sie interagieren über ihren TCR und den CD4-Korezeptor mit MHC II. Kl. II-Proteine sind nur auf speziellen Immunzellen, den Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Also auf den Zellen, mit denen T-Helferzellen auch kommunizieren. APCs sind z.B. Dendritische Zellen (DCs), B-Zellen oder Makrophagen. Kl. II-Moleküle präsentieren auch keine Peptide aus zellulären Proteinen, sondern Peptide, deren Proteinvorläufer über spezialisierte Rezeptoren von außen aufgenommen und in der Zelle prozessiert wurden.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum des adaptiven Astes des Immunsystems ist der Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses: Bei erneuter Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger wird dieser schneller und effizienter eliminiert.

1.2 MHC

1.2.1 MHC-Gene: Locus und Polymorphismus.

Die Funktionen der MHC Kl. I- und II-Moleküle wurden im vorangehenden Abschnitt bereits kurz umrissen, nun soll auf die sie codierenden Gene, deren besondere Lage – den MHC – und ihre Vielzahl an polymorphen Allelen, näher eingegangen werden.

Der MHC ist ein ausgedehnter, 4 Mb¹ (AMADOU et al. 1999; SHIINA et al. 1999) umfassender Locus, der u.a. Gene zur Präsentation und Prozessierung von Antigenen trägt. Seine anfängliche Charakterisierung und seinen Namen verdankt er allerdings der Forschung an der Transplantatabstoßung, einem „Nebeneffekt“ der TC-vermittelten Immunität.

Der Multigenkomplex MHC kann in drei Gebiete (I, II und III) grob unterteilt werden, die bei nahezu allen Vertretern der Vertebraten ähnlich angeordnet sind (PARHAM 1999). MHC Kl. I- und Kl. II-Gene treten das erste Mal in den frühen Vertebraten vor ca. 400 Mio. Jahren auf, gleichzeitig mit dem gesamten adaptiven Immunsystem (PARHAM 1999). Einzelne Gene der Kl. II- und III-Region sind jedoch viel älter, bis zu 700 Mio. Jahre (SEQUENCING CONSORTIUM 1999). Im Rahmen dieser Arbeit soll ausschließlich auf HLA, den MHC des Menschen (Chromosom 6p21.3), auf H-2, den MHC der Maus (MMU17) und auf RT1, den MHC der Ratte (RNO20) näher eingegangen werden.

Beim Menschen liegt die Kl. II-Region proximal (centromergelegen) auf HSA6, gefolgt von der Kl. III-Region und distal (telomer) abgeschlossen durch die Kl. I-Region. Bei Maus und Ratte hat eine Insertion eines kleinen Fragments der Kl. I-

¹Da HFE 4 Mb telomer von HLA-F gefunden wurde, wird die Größe jetzt auch als 8 Mb angegeben (KASAHARA 1999).

Region (H2-K bzw. RT1.A) proximal der Kl. II-Region stattgefunden (GÜNTHER 1996; AMADOU et al. 1999), Abb. 1.1.

Die Kl. I-Region dehnt sich über 1,8 Mb aus (SHIINA et al. 1999) und ist das – evolutionär betrachtet – divergierendste der drei Gebiete (YEAGER und HUGHES 1999; AMADOU et al. 1999; GÜNTHER 1996). Der GC-Gehalt (46%) und die Gendichte dieser Region (118 beim Menschen) sind sehr hoch und die codierten Gene üben teils immunrelevante Funktionen aus (SHIINA et al. 1999):

Im MHC-I-Locus gibt es drei Arten von Genen, klassische (Ia), nicht klassische (Ib) und solche, die überhaupt nicht mit MHC-Genen verwandt sind. Die Ia-Gene wurden schon im vorhergehenden Abschnitt besprochen. Sie sind hochpolymorph, auf nahezu allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und bewirken die Restriktion der zytotoxischen T-Zellen: Die T-Zellen erkennen Antigen im Zusammenhang mit körpereigenem, aber nicht mit körperfremden MHC (ZINKERNAGEL und DOHERTY 1974). Beim Menschen sind Ia-Gene HLA-A, -B und -C, bei der Maus H2-K, -D und -L und bei der Ratte RT1.A1 und RT1.A2 (SHIINA et al. 1999; GÜNTHER 1996; JOLY et al. 1998). Das Vorkommen von zumindest zwei Ia-Genen auch bei der Ratte, die beide in der A-Region liegen, wurde erst kürzlich entdeckt (JOLY et al. 1996; JOLY et al. 1998).

Ib-Gene gibt es sehr viele, sie üben nur teils immunrelevante Funktionen aus und sind nicht so gut charakterisiert wie die Ia-Gene (WILSON und P.J. 1998; BRAUD et al. 1999). Sie sind vermutlich in jeder Ordnung eigenständig aus den Ia-Genen entstanden, da sie mit den Ia-Genen derselben Ordnung verwandter sind als mit den Ib-Genen einer anderen (YEAGER und HUGHES 1999; HUGHES et al. 1999). Sie sind — im Vergleich zu Ia-Genen — häufig weniger stark und gewebespezifischer exprimiert, sie sind wenig polymorph und ihre Genzahl schwankt sogar unter Haplotypen² einer Spezies gewaltig. Beim Menschen sind z.B. HLA-E, -F, -G, -H und MIC A und B gut charakterisiert; zu den MICs sind Homologa weder bei der Maus noch bei der Ratte bekannt (GÜNTHER 1996; AMADOU et al. 1999). Die Ib-Gene der Maus liegen in den Q-, T- und M-Regionen (AMADOU et al. 1999). Bei der Ratte liegen ca. 60 (hier gibt es vermutlich die meisten) Ib-Gene in der C/E-Region (GÜNTHER 1996). Außerdem gibt es bei allen drei Spezies nicht MHC-codierte Kl. I-artige Gene, wie z.B. CD1 oder FcRn.

In der I-Region liegen des weiteren Gene, die weder mit Kl. I-Genen verwandt sind, noch eine immunologische Funktion ausüben. Diese Gene sind ortholog zwischen den Arten und bilden eine Art „ancestral framework“ (einen „Rahmen“, aufgespannt von ursprünglich vorhandenen Genen), innerhalb dessen die Kl. I-Gene inserieren und expandieren konnten (AMADOU et al. 1999).

²Der Haplotyp sind die Gene in einem haploiden Genom, die in Kombination vererbt werden. Also eine Gruppe von Genen, die auf einem Chromosom liegen und so nahe benachbart sind, daß sie ohne Rekombination als Ganzes vererbt werden. Das Paradebeispiel einer derartigen Gengruppe, die als Haplotyp vererbt wird, ist der MHC.

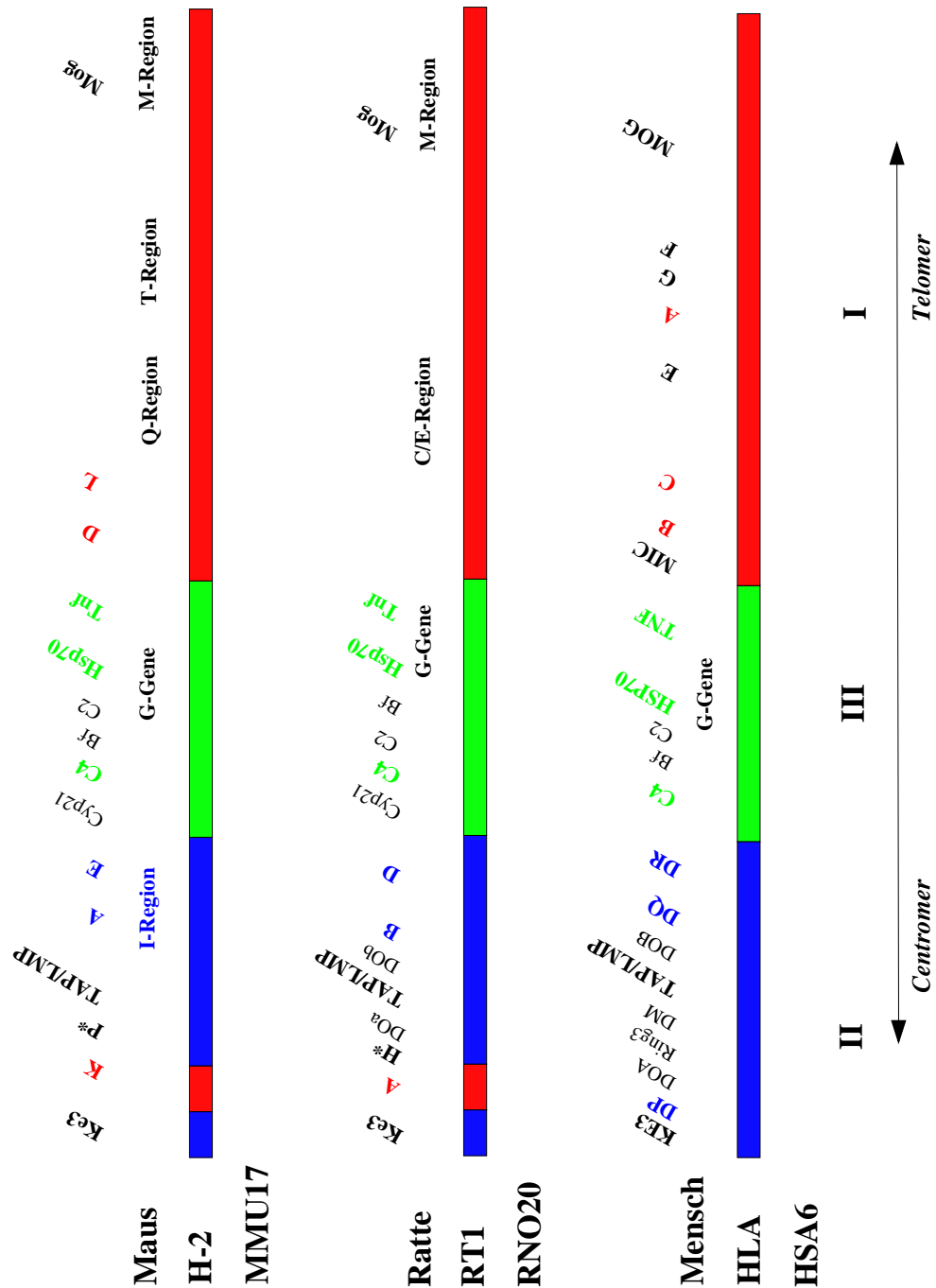


Abbildung 1.1: Eine Übersicht der MHC-Loci von Maus, Ratte und Mensch im Vergleich (GÜNTHER 1996; AMADOU et al. 1999; SEQUENCING CONSORTIUM 1999).

Die Kl. I-Region ist rot markiert, die Kl. II-Region blau und die Kl. III-Region grün. Bedeutende Gene dieser Regionen sind farblich hervorgehoben.

Die Kl. II-Region dehnt sich über 1,2 Mb aus und trägt (mit Ausnahme von Ring3) ausschließlich Gene, die eine Funktion bei der Antigenpräsentation und -prozessierung ausüben (BECK und TROWSDALE 1999).

Die Antigenpräsentation wird von den klassischen Kl. II-Genen ausgeübt: HLA-DQ, HLA-DR und HLA-DP beim Menschen, H-2IA und H-2IE bei der Maus (H-2P ist ein Pseudogen) und RT1.B und RT1.D (RT1.H ist ein Pseudogen) bei der Ratte. Sie besitzen teils mehrere Exemplare der α - und β -Kette und präsentieren den Helfer-T-Zellen Antigen. Beteiligt an der Antigenprozessierung sind die Gene für TAP1 und 2, Tapasin, LMP2 und 7, und die nicht klassischen Kl. II-Genen DM (entsprechend H-2M bzw. RT1.M) und DO (H-2O, RT1.DO).

Die Divergenz der Gene der Kl. II-Region liegt zwischen denen der Kl. I- und der Kl. III-Region, die Kl. II-Region hat mit 40 % einen geringeren GC-Gehalt als die Kl. I- und Kl. III-Region und trägt auch weniger (40) Gene (BECK und TROWSDALE 1999).

Die Kl. III-Region (knapp 1 Mb) ist der älteste und konservierteste Teil des MHC (KASAHARA 1999), Gendichte sowie GC-Gehalt sind hier sehr hoch (PARHAM 1999). Die Kl. III-Genen sind immunologisch nur teilweise relevant, Kl. III-Genen sind z.B. Gene der Komplementkaskade (C2, Bf und C4), das 21-Hydroxylase-Gen Cyp21, Gene der Hitzeschockprotein-Familie (Hsp70), TNF α und β (Tumornekrosefaktor) und weitere, wie z.B. die Gene der G(BAT)-Serie.

Ein Charakteristikum der klassischen Kl. I- und fast aller Kl. II-Genen ist ihr hoher Grad an Polymorphismus: für einzelne Gene kann es mehr als 200 Allele geben (SEQUENCING CONSORTIUM 1999; PARHAM 1999). Dieser Polymorphismus ist bedingt durch Selektion, so lassen sich z.B. echte Mutationen häufiger finden als stumme und die Introns sind weniger polymorph als die Exons (YEAGER und HUGHES 1999).

Die Ursache für den Selektionsdruck in Richtung eines hohen Grades an Polymorphismus ist vor allem die „frequency dependent selection“ durch Pathogene auf Populationsebene: Jedes MHC-Allel ist in der Lage, ein breites, aber dennoch begrenztes Spektrum an Peptiden (siehe später: Ankerreste) zu präsentieren. Das führt zur evolutionären Auslese von Individuen mit MHC-Molekülen, die durch Präsentation der Krankheitserreger dem Immunsystem einen Angriffspunkt bieten können und damit dem Organismus die Möglichkeit geben, zu überleben und sich zu reproduzieren (HILL 1999; CARRINGTON et al. 1999).

Individuen mit häufigen Allelen haben einen selektiven Nachteil, da sich Krankheitserreger, die von diesen Allelen nicht präsentiert werden können, besonders gut (in sehr vielen Individuen) ausbreiten können. Das führt dazu, daß diese Allele seltener werden und letztlich dazu, daß alle Allele in gleichen Mengen exprimiert werden (POTTS und SLEV 1995).³ Entsprechend der Selektion der MHC-

³Ausnahmen: Papua-Neuguinea: 60 % der Bevölkerung tragen das HLA-A11 Allel \Rightarrow EBV

Moleküle auf die Präsentation von möglichst vielen verschiedenen Peptiden hin, liegt der Ort des höchsten Polymorphismus in einem MHC-Molekül auch in den Peptidbindungsregionen, so daß sich die Allele vor allem in ihren Peptidbindungseigenschaften unterscheiden.

Auf der Populationsebene führt dieser Selektionsdruck also zu Polymorphismus, auf der Ebene des Individuums hingegen zur Polygenie (jeweils drei Kl. I- und Kl. II-Loci beim Menschen) und verursacht den „heterozygote advantage“ (einen Vorteil für MHC-Allel-heterozygote Individuen) (POTTS und SLEV 1995): je mehr unterschiedliche Allele ein einzelnes Individuum exprimiert, desto höher ist seine persönliche Fitness (HILL 1999). Die Kl. I-Expression der jeweils drei Loci erfolgt kodominant von den homologen Chromosomen. Selten wird von einem Locus das gleiche Allel auf beiden Chromosomen exprimiert, so daß die meisten Menschen sechs verschiedene Kl. I-Gene exprimieren.

Auf genetischer Ebene entstehen diese Polymorphismen mittels Punktmutation, kleinerer Deletionen und Insertionen, Rekombination – auch zwischen nicht homologen Gebieten – und Genkonversion⁴ (PARHAM 1999). Die Organisation des MHC in einem Cluster mit Familien homologer Gene erhöht aufgrund der Möglichkeit der Genkonversion und anderer Rekombinationsarten die Geschwindigkeit der Evolution (PARHAM 1999).

Dabei sind die Gene im MHC einer Veränderung unterschiedlich zugeneigt und unterstützen die Rekombination unterschiedlich stark: Gene, die mit der Entwicklung oder essentiellen zellulären Funktionen zu tun haben, erhöhen die Stabilität des MHC – hier würden Änderungen zum Tod des Individuums führen –, gleichzeitig aber sind sie auch die Orte der homologen Rekombination und damit „recombinational hotspots“ (bevorzugte Stellen der Rekombination). Auf die klassischen Kl. I- und Kl. II-Gene dagegen wirkt der Selektionsdruck in Richtung auf die Veränderung des MHC. Da diese Gene aber auf den homologen Chromosomen nicht gleich sind, führt das zu einer Unterdrückung der Rekombination an diesen Orten. Sie bilden damit „polymorphic frozen blocks“ („eingefrorene“ Regionen, die polymorphe Loci enthalten), was zur Stabilisierung von Haplotypen, also bestimmter Genkombinationen, bzw. zur Erhaltung der Variabilität führt (RACHED und MCDERMOTT 1999; YEAGER und HUGHES 1999; PARHAM 1999).

Für die Transplantatabstoßung sind – wie der Name schon vermuten läßt – nicht nur die major histocompatibility Gene verantwortlich, sondern es gibt auch minor histocompatibility Gene, die ebenfalls eine, wenn auch untergeordnete, Rolle spielen; bei HLA-identischen Geschwistern z.B. führen sie zu verzögerter

von dort hat eine Mutation, so daß es von diesem Allel nicht präsentiert werden kann.

⁴Ein Stück aus einem Gen wird durch ein Stück eines in der Meiose gepaarten homologen Chromosoms ersetzt.

Abstoßung. Sie sind nicht MHC-codiert und sind über das gesamte Genom verteilt. Sie führen zu unterschiedlicher TC-Restriktion, da sie polymorph sind und dabei so abundant und gut präsentiert, daß sie immundominant wirken. Beispiele sind die mitochondrial (also maternal) vererbten Gene ND1 und COI oder SMCY auf dem Y-Chromosom (SIMPSON und ROOPENIAN 1997).

1.2.2 Die dreidimensionale Struktur der MHC-Proteine.

In diesem Abschnitt wird die Struktur der Kl. I-Moleküle erläutert. Dabei wird zunächst der allgemeine Aufbau erklärt, dann etwas genauer auf die Peptidbindung eingegangen und schließlich kurz die Assoziation mit dem Korezeptor CD8 erwähnt. Zuletzt wird nur knapp auf die Struktur der Kl. II-Moleküle eingegangen, da sie für die vorliegende Arbeit weniger wichtig sind.

Ein MHC Kl. I-Molekül ist ein nicht kovalent assoziiertes heterodimeres Glykoprotein, aus der MHC-codierten 45 kDa α -Kette und dem nicht MHC-codierten löslichen 15 kDa β_2 -Mikroglobulin (β_2m). Als dritte Komponente, die für die Stabilität des Komplexes ebenso unerlässlich ist wie β_2m , kommt das (ebenfalls) nicht kovalent gebundene, präsentierte Peptidfragment hinzu, das bei Kl. I-Molekülen typischerweise acht bis elf Aminosäuren lang ist (MADDEN 1995), Abb. 1.2.

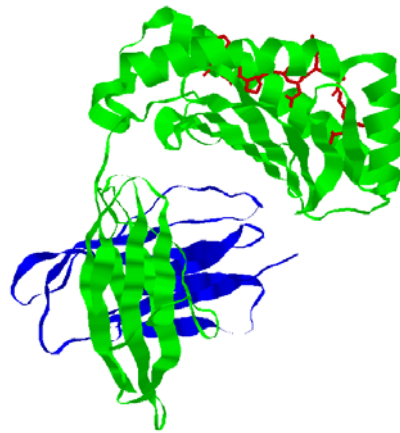


Abbildung 1.2: Das Maus H-2D^b MHC Kl. I-Molekül (α -Kette in grün) ist hier komplexiert mit humanem β_2m (blau) und – als Peptidfragment (rot) – mit dem Sendai-Virus-Nukleoprotein_{324–332} (GLITHERO et al. 1999).

Die α -Kette, auch schwere Kette genannt, umfaßt drei extrazelluläre Domänen (α 1-3), eine membrandurchspannende Region und eine zytoplasmatische Domäne; β_2m , die leichte Kette, besteht aus nur einer Domäne, die wie die α 3-Domäne der schweren Kette in einer Immunglobulinfaltung vorliegt (Abb. 1.3).

Diese beiden, $\alpha 3$ und β_2m , bilden zusammen den membranproximalen Teil des Kl. I-Moleküls. Der membrandistale Bereich, der dem TCR zugewandt ist und die Peptidbindungsregion bildet, wird durch ein „intrachain Dimer“ der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen der schweren Kette gebildet. Zu diesem „intrachain Dimer“ steuert jede Domäne vier Faltblätter und eine Helix bei, so daß insgesamt eine Grundfläche aus acht antiparallelen β -Faltblättern entsteht, an deren Seiten zwei antiparallele α -Helices aufliegen (Abb. 1.3). Dadurch wird eine Grube gebildet, in der das Peptid gebunden ist.



Abbildung 1.3: Hier ist das gleiche MHC Kl. I-Molekül wie in Abb. 1.2 zu sehen, wobei die einzelnen Domänen – zur Erkennung des „intrachain Dimer“ – farblich voneinander abgehoben sind.

Die $\alpha 1$ Domäne ist hellblau markiert, $\alpha 2$ dunkelgrün und $\alpha 3$ grün, das Peptid ist rot und β_2m grau dargestellt.

Die Peptidbindungsgrube der Kl. I-Moleküle ist 25 Å lang, in der Mitte bis zu 12 Å breit und an den Enden geschlossen. Entlang dieser Grube gibt es Vertiefungen, auch Taschen genannt, die – in Richtung N- bis C-Terminus der $\alpha 1$ -Helix – von A bis F durchnummeriert werden. Diese Taschen sind in den verschiedenen Allelen hochpolymorph in Bezug auf Lage, Ausdehnung und Ladung, so daß sie sehr unterschiedliche Peptide binden können (FREMONT et al. 1992). Die am Ende befindlichen Taschen (A und F) bauen sich jedoch auch aus konservierten Aminosäuren auf, die daher auch als kanonisch bezeichnet werden: Tyr7, Tyr59, Tyr159, Trp167 und Tyr171 in der A-Tasche und Tyr84, Thr143, Lys146 und Trp147 in der F-Tasche (MADDEN 1995). Diese konservierten Reste kontaktieren die Enden des Peptids (N- und C-Terminus), sie legen dadurch seine Orientierung fest, neutralisieren seine Ladung und schränken die Länge ein, die Peptide aufweisen können, um gebunden zu werden (COLLINS und FREILINGER 1998).⁵

⁵Es existieren allerdings Ausnahmen, es gibt Peptide, die an Kl. I-Moleküle gebunden sind, obwohl sie über die Grube hinausabhängen (COLLINS et al. 1994).

Bei der Ratte gibt es Ausnahmen von diesen kanonischen Resten: Es können Substitutionen in der A- und F-Tasche an ein bis drei möglichen Positionen (143, 147 und 167) auftreten (STEVENS et al. 1998), Abb. 1.4.

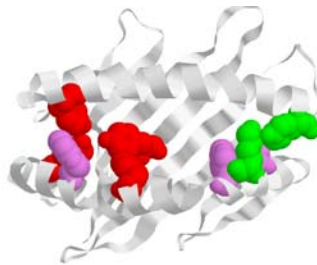


Abbildung 1.4: Ein Ratte-MHC Kl. I-Molekül. Die kanonischen Reste der A-Tasche sind rot markiert, die der F-Tasche grün. Die kanonischen Aminosäurepositionen, für die es bei der Ratte Alternativen gibt, sind violett hervorgehoben. Es sind nur die Domänen 1 und 2 der α -Kette gezeigt.

Ein Großteil der Peptidbindungsenergie geht von den kanonischen Resten an den Enden der Grube aus. Da sie Hauptkettenatome der Peptidtermini kontaktieren, ist dieser Beitrag von der Peptidsequenz unabhängig (BUUS 1999).

Weitere Bindungsenergie geht von polymorphen und konservierten Aminosäuren der Peptidbindungstaschen des MHC-Moleküls aus, die dabei Haupt- und Seitenkettenatome des Peptids binden können.

Die polymorphen MHC-Aminosäuren, die Kontakte zu Seitenkettenatomen des Peptids knüpfen, liefern zwar nur einen geringen Teil der Bindungsenergie, dennoch bestimmen sie das Peptidmotiv des MHC-Moleküls (MADDEN 1995): Sie legen fest, welche primären Ankeraminosäuren ein Peptid besitzen muß, um von einem bestimmten MHC-Molekül gebunden werden zu können. Diese Ankeraminosäuren liegen meist v.a. an Position 2 und 9 des Peptids und binden entsprechend in den Taschen B und F des MHC-Moleküls (REIZIS et al. 1997; THORPE et al. 1995). So kann also jedes MHC-Allel ein eingeschränktes, definiertes Spektrum an Peptiden präsentieren, ca. 8 % der möglichen Nonamer-Peptide (BUUS 1999).

Neben diesen primären Ankerresten gibt es noch sekundäre und des weiteren für bestimmte Positionen nicht erlaubte Reste (MADDEN 1995).

Das Peptid liegt in einer gestreckten Konformation tief in der Grube, wobei es in der Mitte vom Boden abhebt und in Richtung TCR zeigt, so daß diese mittleren Reste weniger wichtig für die MHC-Bindung, dafür umso bedeutender für die TCR-Erkennung sind. Der Bereich der Peptidbindung und TCR-Kontaktierung ist der polymorphste des MHC-Moleküls (Abb. 1.5).

Der Korezeptor der Kl. I/TCR-Bindung, CD8, bindet das MHC-Molekül hauptsächlich an der $\alpha 3$ -Domäne, aber er kontaktiert auch $\alpha 2$ und $\beta 2m$ (GAO et al.

1997; KERN et al. 1998), Abb. 1.6.

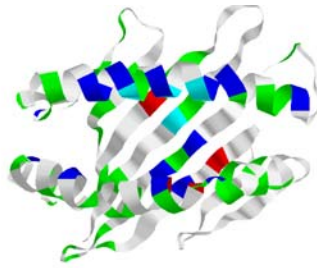


Abbildung 1.5: Ein Ratte Kl. I-Molekül; die polymorphen Aminosäuren sind hervorgehoben.

Nur die α 1- und α 2-Domänen sind gezeigt. Grün sind Reste markiert, die im Vergleich von dreizehn Ratte Kl. Ia-Sequenzen (JOLY et al. 1998) zwei verschiedene Aminosäuren aufweisen, blau sind sie bei drei verschiedenen, rot bei vier und hellblau bei fünf verschiedenen Aminosäuren.



Abbildung 1.6: Das humane MHC Kl. I-Molekül HLA-A2 komplexiert mit einem CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer.

Die MHC- α -Kette ist grün dargestellt, β_2 -Mikroglobulin blau und das Peptid rot. Von dem CD8- $\alpha\alpha$ -Homodimer sind nur die immunglobulinartigen Domänen gezeigt, beide in violetten Schattierungen (GAO et al. 1997).

Ein Kl. II-MHC-Molekül ist ein Heterodimer aus den polymorphen MHC-codierten α - und β -Ketten, die jeweils ca. 30 kDa schwer und nicht kovalent assoziiert sind (Abb. 1.7).

Die N-terminalen Domänen beider Ketten, α 1 und β 1, bilden zusammen die distal gelegene Peptidbindungsdomäne, diesmal ein „interchain Dimer“. Die beiden folgenden Domänen, α 2 und β 2, bilden den membranproximal gelegenen Teil des Moleküls; sie weisen beide eine immunglobulinähnliche Faltung auf. Den C-

Terminus bildet jeweils eine membrandurchspannende Region, gefolgt von einem zytoplasmatischen Teil.

Die Bindungsrichtung des Peptids ist – wie in den Kl. I-Molekülen – festgelegt, die Grube ist jedoch offen, so daß auch längere Peptide (14-20 AS) aufgenommen werden können (MADDEN 1995).

Auch hier gibt es konservierte MHC-Reste, die Kontakte zur Peptidhauptkette knüpfen, sie liegen aber nicht – wie in Kl. I – gehäuft an den Enden der Grube, sondern verstreut über die gesamte Peptidbindungsregion. Das sind die Reste Asn62, Asn69 und Arg76 in der α -Kette und His81 und Asn82 in der β -Kette (MADDEN 1995).

Die das Peptidbindungsmotiv bestimmenden Aminosäuren sind über die gesamte Grube verteilt und weniger stark restringierend als in den Kl. I-Molekülen, so daß ein gegebenes Kl. II-Molekül mehr verschiedene Peptide binden kann als ein Kl. I-Molekül.

Das Peptid liegt hier in einem „left handed twist“ (einer Linksdrehung) in einer Polyprolin-II-Helixkonformation vor (MADDEN 1995).

Der CD4-Korezeptor bindet mit seinen CDR2- und CDR3-Schleifen an nicht polymorphen Stellen der α - und β -Kette (WU et al. 1997; LI et al. 1998).



Abbildung 1.7: Das Maus I-A^d MHC Kl. II-Molekül komplexiert mit einem Peptid (grau), die α -Kette ist dabei blau markiert, die β -Kette grün (SCOTT et al. 1998).

1.2.3 Beladung der MHC-Proteine mit Peptid.

In diesem Abschnitt soll dargelegt werden, wie die Beladung der MHC-Proteine mit Peptiden abläuft. Das funktioniert bei den Kl. I-MHC-Molekülen, die Peptide aus zytosolischen Proteinen präsentieren, und den Kl. II-Molekülen, die von außen aufgenommenes Antigen darbieten, auf ganz unterschiedliche Art:

Beladung von MHC Kl. I-Molekülen.

MHC Kl. I-Moleküle, die von nahezu allen Körperzellen exprimiert werden, werden von CD8-T-Zellen erkannt. Die Funktion dieser zytotoxischen T-Zellen ist es, zu überwachen, ob die untersuchte Zelle virusinfiziert oder von intrazellulären Mikroorganismen befallen ist. Dafür müssen CD8-T-Zellen ins Innere der Zellen blicken. Das gelingt ihnen mit Hilfe der Kl. I-Moleküle, die mit Peptiden beladen sind, deren Proteinvorläufer intrazellulären Ursprungs sind:

Zelluläre Proteine werden, wenn sie nicht mehr gebraucht werden, ubiquitiniert und dadurch für den Abbau durch das Proteasom gekennzeichnet. Das Proteasom ist ein großer Komplex im Zytoplasma, der aus vier Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten besteht und der ubiquitinierte zytoplasmatische Proteine zu Peptidfragmenten zerschneidet.

Diese Peptide werden durch den TAP-Transporter, der die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) durchspannt, in das ER hineintransportiert. Der TAP-Transporter besteht aus zwei Untereinheiten (1 und 2) und gehört zur ABC- (engl. ATP-binding cassette für ATP-Bindungskassette) Familie der Transportproteine. Der Peptidtransport benötigt eine ATP-Hydrolyse.

Bei der Ratte gibt es zwei TAP2-Allele, die unterschiedliche Peptidtransport-Eigenschaften aufweisen: Dem TAPB-Allel-codierten Molekül fehlt die Möglichkeit, Peptide mit positiv geladenem C-Terminus zu transportieren, das TAPA-Allel-codierte Molekül dagegen weist diese Fähigkeit auf (THORPE et al. 1995; POWIS et al. 1996). Das Maus-TAP entspricht dabei eher dem Ratte-TAPB-Allel (JOLY et al. 1994). Dieses Phänomen ist von Bedeutung, da es Ratte-MHC Kl. I-Moleküle mit einer sehr sauren F-Tasche gibt, die daher Peptide mit positiv geladenem C-Terminus benötigen, wie z.B. das A^a- oder auch das A^f-Molekül. Für eine Versorgung von MHC-I mit gut bindenden Peptiden müssen diese MHC-Allele also mit dem 2A-Allel des Transporters assoziiert sein (JOLY et al. 1998).

Beide Ketten der MHC Kl. I-Moleküle werden unabhängig am rauhen ER synthetisiert und kotranslational hineintransportiert.

Die schwere Kette wird glykosyliert und bindet an eine Reihe von Chaperonen: Zunächst wohl an Calnexin, nach Ablösung davon bindet sie β_2m und Calreticulin. An TAP gebunden liegt das noch leere (ohne Peptid) Kl. I-Molekül dann in einem Komplex vor, der neben Calreticulin noch Tapasin enthält. Hier findet die Peptidbeladung statt. Zur Optimierung der Beladung wird der Komplex möglicherweise noch etwas im ER zurückgehalten (LEWIS und ELLIOTT 1998).

Schließlich gelangt er in den Golgiapparat, wo N-gebundene Kohlenhydrate modifiziert werden und von dort an die Plasmamembran. Leere Moleküle – ohne Peptid – sind instabil und dissoziieren sehr schnell (YORK und ROCK 1996).

Beladung von MHC Kl. II-Molekülen.

Kl. II-Moleküle werden nur von speziellen Immunzellen exprimiert, z.B. von B-Zellen, Dendritischen Zellen (DCs) oder Makrophagen. Diese nehmen Antigen über spezifische Rezeptoren (z.B. BCR, FcR, Komplementrezeptor, Mannose-rezeptor) oder unspezifisch z.B. durch Makropinozytose (DCs) von außen auf. Kl. II-Moleküle werden von CD4-T-Zellen erkannt.

Wie bei MHC-I werden auch die einzelnen Ketten der Kl. II-Moleküle am ER synthetisiert, assoziieren dann aber sofort mit Ii (der invarianten Kette) zu Nonameren aus jeweils drei α -, β - und Ii-Ketten. Die Peptidbindungsregion der MHC-Proteine wird dabei von der CLIP-Domäne der Ii-Kette verdeckt, so daß keine ER-Peptide (die ja aus dem Zytosol stammen) binden können. Nach der Passage des Golgiapparats – dort findet die terminale Glykosylierung statt – gelangen diese Nonamerkomplexe über das Trans-Golginetzwerk schließlich zu endozytotischen Vesikeln, den MIICs (GEUZE 1998).

Dorthin gelangen letztlich auch die von außen aufgenommenen Proteine: Zuerst in die frühen Endosomen, die sich über späte Endosomen schließlich zu Lysosomen entwickeln. Diese sind sehr sauer und weisen eine hohe proteolytische Aktivität auf. Unter anderem durch die Cathepsine D, L und S findet der Abbau der internalisierten Proteine statt. Genauso wird dort auch Ii degradiert, nur das CLIP-Peptid bleibt solange gebunden, bis es schließlich — HLA-DM⁶-katalysiert — durch ein gut bindendes Peptid ausgetauscht wird, das aus den von außen aufgenommenen Proteinen stammt. Anschließend können die Kl. II-Moleküle an die Zelloberfläche gebracht werden (WATTS 1997; CHAPMAN 1998).

In Makrophagen und DCs zumindest hat das extrazellulär aufgenommene Antigen auch Zugang zu Kl. I-Molekülen. Das führt dazu, daß DCs auch dann CD8-T-Zellen aktivieren können, wenn sie gar nicht selbst befallen sind. In dem „cross-priming“ genannten Vorgang nehmen die DCs Trümmer toter Zellen auf und präsentieren deren Proteinfragmente auf Kl. I-Molekülen (SCHUMACHER 1999; HEATH und CARBONE 1999; LANE und BROCKER 1999).

1.3 TCR

1.3.1 Gensegmentanordnung und Rekombination.

Wie schon im ersten Kapitel erwähnt, werden die Gene für die TCR-Ketten erst bei der somatischen Rekombination während der TC-Reifung im Thymus zusammengesetzt. Die codierende Region für die variable Domäne der TCR α -Kette wird dabei aus einem V- und einem J-Segment zusammengebaut, die für die β -

⁶HLA-DM ist der Peptideditor; bei der Maus wird er H-2M und bei der Ratte RT1.M genannt.

Kette aus V, D und J. Im Genom gibt es vor der somatischen Rekombination jeweils einen ganzen Block solcher Segmente, aus denen zufällig jeweils ein Segment ausgewählt wird.

Die Vielfalt der V-Segmente ist im TCR-Locus viel geringer als im Immunglobulinlocus: im ersten gibt es 100 $V\alpha$ - und 30 $V\beta$ -Segmente gegenüber jeweils 250 V_H - und V_L -Segmenten im letzteren⁷. J-Segmente aber gibt es im TCR-Locus mehr: 50 $J\alpha$ - und 12 $J\beta$ -Segmente statt der jeweils vier J-Segmente im BCR-Locus.

Beim TCR werden N- und P-Nukleotide nicht nur zwischen V und D und zwischen D und J der β -Kette eingelagert, sondern auch zwischen V und J der α -Kette. Beim BCR im Vergleich werden in der leichten Kette, deren variabler Bereich sich auch nur aus V- und J-Segmenten zusammensetzt, keine N- oder P-Nukleotide eingebaut. Die variable Domäne der schweren Kette eines Immunglobulins setzt sich wieder aus V-, D- und J-Segmenten zusammen und zwischen diesen gibt es auch N- und P-Nukleotide.

Die Komplementarität-bestimmenden Regionen (CDR, engl. complementarity determining regions), die die höchste Variabilität aufweisen und das Antigen kontaktieren, sind im Fall von CDR1 und CDR2 V-Segment codiert, wohingegen CDR3 erst aus der Verknüpfung von V und J (α -, leichte Kette), bzw. V, D und J (β -, schwere Kette) entsteht. Damit sind die CDR1- und CDR2-Schleifen des TCR weniger variabel als die des BCR, da sie weniger V-Segmente enthalten (ARDEN 1998), aber die CDR3-Schleifen sind variabler als die des BCR, da sie mehr D- und J-Segmente enthalten und N- und P-Nukleotide auch in der α -Kette aufweisen (ROCK et al. 1994).

Dieser Unterschied in der Variabilität hat sein Pendant in den verschiedenen Aufgaben, die mit diesen Rezeptoren ausgeführt werden: Der BCR erkennt antigene Determinanten auf löslichen Molekülen, alle sechs CD-Regionen tragen zur Erkennung bei, die in der Mitte befindlichen CDR3-Schleifen aber am stärksten und deshalb weisen sie auch die höchste Variabilität auf. Der TCR dagegen erkennt Antigen nicht alleine, sondern an MHC-Moleküle gebunden. Ein Großteil der Erkennung konzentriert sich dabei auf konservierte Aminosäurepositionen des MHC-Moleküls und den Hauptanteil an der MHC-Erkennung tragen die CDR1- und CDR2-Schleifen, so daß dort eine verminderte Diversität mit limitierter Auswahl an wenigen kanonischen Strukturen ausreicht (ARDEN 1998). Die CDR3-Schleifen hingegen erkennen vor allem das höchst variable antigene Peptid, so daß die TCR-CDR3-Vielfalt die der Immunglobuline übertrifft, obwohl die CDR3-Längen der TCRs homogener sind als die der Immunglobuline (ROCK

⁷Diese Angaben gelten für die Maus. In den verschiedenen Spezies unterscheiden sich die absoluten Zahlen.

V_H ist das V-Segment der schweren Ig-Kette, V_L gehört zur leichten Kette des BCR.

et al. 1994).

1.3.2 TCR-Struktur

Der TCR ist ein Heterodimer aus den disulfidverknüpften α - und β -Ketten. Beide Ketten bestehen aus jeweils einer konstanten (C) und einer variablen (V) immunoglobulinähnlichen Domäne, wobei letztere die pMHC-Erkennung vermittelt. Die Domänenstruktur und die Sequenz des TCR ähneln dem Fab-Fragment eines Immunglobulins, wobei es allerdings Abweichungen in den C α - und V α -Domänen gibt (BJORKMAN 1997).

Eine immunoglobulinartige Domäne besteht aus neun antiparallelen β -Strängen, die zu zwei sandwichartig übereinanderliegenden β -Faltblättern geformt sind. In der V-artigen Immunoglobulindomäne bestehen die – pMHC kontaktierenden – CDRs aus den Schleifen, die die β -Stränge der Falblätter an einem Ende der Domäne miteinander verbinden (Abb. 1.8).

Die Abweichung der TCR-C α -Domäne von der C α -Domäne eines Immunglobulins besteht darin, daß eines der Falblätter eine ungewöhnliche Struktur aufweist und die Disulfidbindung – statt zwischen den übereinanderliegenden Falblättern – zwischen einem β -Strang aus dem normalen Falblatt und einem helikalen Bereich des ungewöhnlichen Falblatts geknüpft ist (BJORKMAN 1997; GARBOCZI und BIDDISON 1999). Dadurch wird diese Domäne flexibler.

Die TCR-V α -Domäne unterscheidet sich von der kanonischen Immunoglobulin-V-Faltung, da der c'-Strang seine Topologie verändert hat und von c'- zum d-Strang auf dem anderen β -Faltblatt gewechselt ist (FIELDS et al. 1995).

Die Paarung der V-Domänen und damit die Anordnung der Antigenbindungsstelle entspricht wieder der Anordnung in Antikörpern: Die CDR3-Schleifen der beiden Ketten treffen sich in der Mitte und werden von den CDR1- und CDR2-Schleifen flankiert (BJORKMAN 1997), Abb. 1.8.

Beide TCR-Ketten besitzen desweiteren eine hydrophobe membrandurchspannende Region, die einige positiv geladene Aminosäuren (zur Assoziation mit der Signalübertragungseinheit CD3) trägt und sie besitzen eine zytoplasmatische Domäne. Letztere ist kurz und geladen und nimmt an der TCR-Signaltransduktion nicht teil.

1.4 TCR/pMHC-Interaktion

1.4.1 TCR/pMHC-Bindung

In den letzten Jahren konnte die Bindung des T-Zell-Rezeptors an pMHC aufgeklärt werden. Einerseits durch funktionelle Daten (TURNER et al. 1997; MAN-

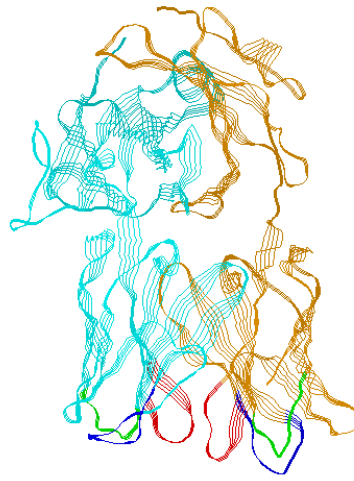


Abbildung 1.8: Der 2C-TCR, die α -Kette in braun, die β -Kette in hellblau. Die CDR1-Schleifen sind grün markiert, die CDR2s blau und die CDR3s rot (GARCIA et al. 1996).

NING et al. 1998; FUKUI et al. 1998; WANG et al. 1998), andererseits aber vor allem durch Röntgenstrukturanalyse an Kristallen des Dreikomponentenkomplexes „TCR, Peptid und MHC“ (GARCIA et al. 1996; GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998; REINHERZ et al. 1999). Hier soll hauptsächlich auf TCR/pMHC-I-Strukturen eingegangen werden, da sie für diese Arbeit wichtiger und besser bekannt sind.

Die Bindung des TCR an pMHC-I erfolgt diagonal. Die Winkel zwischen der Achse der TCR-CDRs zur Geraden, die die MHC-Helices durchläuft, schwanken von 45° (2C-TCR) bis zu 70° (B7-TCR) (REINHERZ et al. 1999).

Der TCR paßt sich zwischen den zwei höchsten Punkten der MHC α -Helices (deren N-Termini) ein, so daß er dem Peptid möglichst nahe kommt (Abb. 1.9).

CDR1 α kommt dabei über dem Peptid-N-Terminus zu liegen und damit auch über dem N-Terminus der MHC- α 1-Helix und dem C-Terminus der α 2-Helix, CDR1 β entsprechend über dem Peptid-C-Terminus und dem entgegengesetzten MHC-Bereich. CDR2 α liegt über der MHC- α 2-Helix und CDR2 β entsprechend über der MHC- α 1-Helix. Die hochvariablen CDR3s liegen über den zentralen Bereichen der MHC- α -Helices und v.a. über der Mitte des Peptids. Dort bilden sie eine Tasche, die eine hervorstehende Aminosäure des Peptids aufnehmen kann (GARCIA et al. 1996; GARBOCZI et al. 1996), Abb. 1.10.

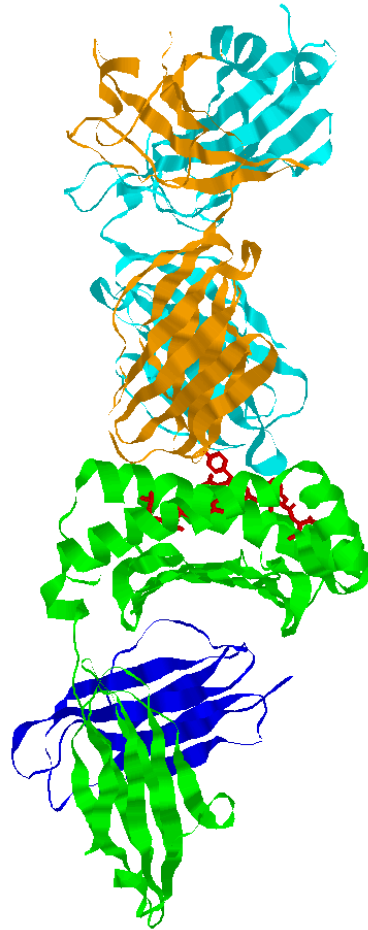


Abbildung 1.9: Diese Abbildung zeigt, wie der TCR zwischen den höchsten Punkten des MHC-Moleküls bindet. Die MHC- α -Helix ist grün markiert, β_2m blau, das Peptid rot, die TCR α -Kette braun und die TCR β -Kette hellblau. Gezeigt ist hier der B7-TCR, der HLA-A2 komplexiert mit dem Tax-Peptid von HTLV-1 bindet (DING et al. 1998).

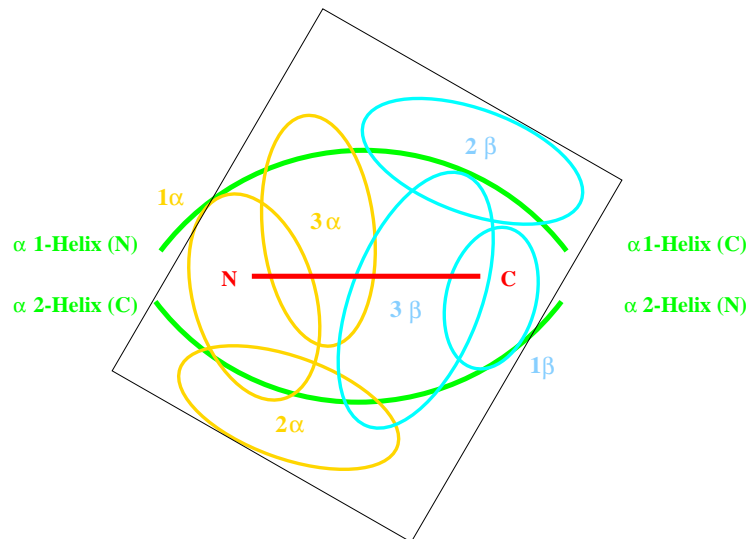


Abbildung 1.10: Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der TCR/pMHC-Kontaktfläche. Die MHC- α -Helices sind grün dargestellt, das Peptid als roter Strich und die CDRs der TCR α -Kette als orange und die der TCR β -Kette als blaue Ellipsen. Das schwarze Rechteck verdeutlicht die diagonale Positionierung des TCR über pMHC.

Die Bindung des D10-TCR an MHC-II erfolgt — im Gegensatz zur eher diagonalen Kl. I-Bindung — orthogonal (REINHERZ et al. 1999). Die Bindung des TCR an Kl. II-Moleküle ist vermutlich uniformer als die an MHC-I-Proteine: Die Bindungsrichtung ist stärker eingeschränkt, da die N-terminalen Aminosäuren des Peptids zusammen mit der MHC-II- α 1-Helix eine Erhebung bilden, die den TCR an einer diagonalen Bindung hindert. Durch die orthogonale Bindung kommt TCRV α über der MHC- β 1-Helix zu liegen und TCRV β über der MHC- α 1-Helix (REINHERZ et al. 1999).

Charakteristisch für alle beschriebenen TCR/pMHC-Kristalle ist, daß die meisten Kontakte des TCR zum MHC-Molekül und nicht zum Peptid geknüpft sind. Dabei werden hauptsächlich konservierte und nicht polymorphe MHC-Aminosäuren kontaktiert⁸. Besonders involviert sind dabei die keimbahncodierten CDR1- und CDR2-Schleifen, vor allem der α -Kette (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998).

CDR1 und CDR2 scheinen also durch die Evolution auf die Erkennung konservierter MHC-Reste selektiert worden zu sein und können damit eine Art inhärenter Präaffinität für MHC-Moleküle vorgeben, unabhängig von deren allelen Po-

⁸2C-TCR kontaktiert z.B. zwei polymorphe Aminosäuren des MHC-Moleküls und dreizehn konservierte.

lymorphismen (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; GARBOCZI und BIDDISON 1999).

Dabei konnte durch Mutation von TCRV α -Sequenzen und Generierung transgener Mäuse gezeigt werden, daß die MHC-Klassen-spezifische Erkennung des TCR in CDR1/2 α liegt (SIM et al. 1996; SIM et al. 1997; SIM et al. 1998b; SIM et al. 1998a): Durch jede der Mutationen Ser27Phe (CDR1) und Ser51Pro (CDR2) der α -Kette konnte ein vormals stärker im CD4-Kompartiment reifer T-Zellen (Kl. II) verwendetes V α -Segment in das CD8-Kompartiment gezogen werden. Diese Daten belegen also weiterhin die durch CDR1 und CDR2 vorgegebene „allgemeine Erkennungsmöglichkeit“ für MHC, hier in der Unterscheidung der beiden Klassen.

Diese Präaffinität liefert auch eine Erklärung für die hohe Alloreaktivität der T-Zellen – 1-10 % von ihnen reagieren mit allogenen MHC-Molekülen, also solchen eines anderen Haplotyps – und ermöglicht das Verständnis der Kreuzreaktivität: ein TCR kann produktiv mit 10⁶ möglichen Peptiden auf einem MHC-Allel interagieren (MASON 1998; ZERRAHN et al. 1997; BJORKMAN 1997).

Somit wird verständlich, warum die CDR1- und CDR2-Schleifen des TCR viel weniger variabel sind als die des BCR.

Im Gegensatz zu diesen beiden CDRs machen die CDR3-Schleifen der TCR- α - und - β -Kette, neben vielen MHC-Interaktionen, besonders viele Kontakte zum Peptid. CDR3 α und - β knüpfen dabei – je nach Modell⁹ – ähnlich viele Kontakte zum Peptid. Für die CDR3-Schleifen ist damit also höchste Variabilität gefordert, auch im Vergleich mit den CDR3-Schleifen der Immunglobuline (GARCIA et al. 1996; GARBOCZI et al. 1996; WANG et al. 1998; DING et al. 1998; REINHERZ et al. 1999).

Insgesamt knüpft der TCR weniger Kontakte zum Peptid als zum MHC. Das liegt daran, daß das Peptid tief in der MHC-Grube gebunden und somit nur beschränkt zugänglich ist. Außerdem weisen nur wenige Aminosäuren in Richtung des TCR. Das sind für MHC-I hauptsächlich die mittleren Aminosäuren des Peptids, die in der CDR3-Tasche aufgenommen werden und häufig auch noch ein bis zwei eher außen gelegene Aminosäuren des Peptids (GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998; GARBOCZI und BIDDISON 1999). In dem einen bekannten TCR/pMHC-II-Kristall werden v.a. die Peptidaminosäuren P5 und P2 kontaktiert (REINHERZ et al. 1999).

⁹Der 2C-TCR macht mit CDR3 β insgesamt nur zwei Kontakte. Das scheint allerdings eher eine Ausnahme zu sein.

1.4.2 Änderung der Strukturen von Peptid/MHC und TCR bei Bindung.

Bei der Bindung des TCR an pMHC finden an den Peptid-kontaktierenden CDRs weiträumige strukturelle Anpassungen statt, wohingegen sich die allgemeine Struktur des TCR nahezu nicht ändert (GARCIA et al. 1998; DING et al. 1999). Diese Flexibilität der CDRs ist ein weiterer Punkt, der die starke Kreuzreaktivität der T-Zellen erklärt (GARBOCZI und BIDDISON 1999).

Peptid und MHC machen bei der Bindung des TCR vergleichsweise viel geringere Änderungen durch: die $\alpha 3$ -Domäne der schweren Kette und $\beta 2m$ drehen sich – im 2C TCR/H-2K^b-Modell – relativ zu den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen um die Aminosäure Leu178 (GARCIA et al. 1998).

Schon diese Resultate sprechen nicht für eine Konformationsänderung des TCR nach pMHC-Bindung, die eine – durch die TCR-Bindung ausgelöste – Signaltransduktion veranlassen könnte. Ein Beweis aber war die Kristallisation von insgesamt vier A6-TCR/pMHC-Komplexen mit unterschiedlichen Peptiden. So läßt sich die TCR-Struktur bei Agonist-Bindung vergleichen mit der bei der Bindung eines von zwei schwachen Antagonisten oder eines schwachen Agonisten (DING et al. 1999).

Ein Agonist ist ein Peptid, das einen gegebenen TC-Klon voll aktivieren kann. Ein schwacher Agonist kann nur einen Teil der TC-Antworten stimulieren. Ein Antagonist kann, bei gleichzeitiger Gabe mit dem Agonisten, wobei der Antagonist im Überschuß vorliegt, die Agonist-Wirkungen blockieren. Diese verschiedenen Peptide unterscheiden sich nicht nur in der Wirkung auf den TC-Klon, sondern auch in der Halbwertszeit der TCR/pMHC-Interaktion und im Muster der TCR ζ -Kettenphosphorylierung, die durch die Erkennung ausgelöst wurde und die den ersten Schritt der TC-Signaltransduktion darstellt (KERSH et al. 1998). Gewöhnlich werden schwache Agonisten/Antagonisten generiert, indem einzelne Aminosäuren des Agonist-Peptids verändert werden (in diesem Fall AS 6, 7 und 8 des Tax-Peptids) und die Wirkung auf den TC-Klon untersucht wird. Voraussetzung dabei ist natürlich, daß die Bindung an den MHC erhalten bleibt (vgl. Abschn. 1.2.2).

In der erwähnten Veröffentlichung (DING et al. 1999) konnte gezeigt werden, daß sich die TCR-Struktur bei Erkennung dieser Liganden – abgesehen von kleinen strukturellen Anpassungen – kaum ändert, obwohl der TC-Klon durch Bindung dieser veränderten pMHC-Komplexe unterschiedlich stark aktiviert werden kann (IFN- γ -Produktion, Zytotoxizität) und diese veränderten Liganden in dem Klon eine unterschiedliche ζ -Ketten-Phosphorylierung auslösen. Damit wird also eine Signalweiterleitung, ausgelöst durch eine – mittels Ligand-Bindung induzierte – Konformationsänderung des TCR, sehr unwahrscheinlich. Zur Zeit ist eher die Bildung einer „immunologischen Synapse“ in der Diskussion: durch

TCR/pMHC-Interaktion werden die auf bestimmten Lipidmembrankomponenten lokalisierten Signaltransduktionsmoleküle in räumliche Nachbarschaft gebracht, wohingegen andere Zelloberflächenmoleküle ausgeschlossen werden (MONKS et al. 1998; XAVIER und SEED 1999; GRAKOUÏ et al. 1999).

1.4.3 Besonderheit der TCR/pMHC-Interaktion.

Ein wichtiger Punkt zum Verständnis der TCR/pMHC-I-Erkennung ist, – trotz der strukturellen Ähnlichkeit des TCR mit dem Fab-Fragment – die sehr unterschiedliche Bindung:

Das kontaktierte Gebiet ist größer, 1.000 \AA^2 beim TCR im Vergleich zu $600\text{--}900 \text{ \AA}^2$ beim BCR, die Komplementarität der TCR/pMHC-Kontaktfläche ist aber relativ gering, so daß die Affinität des TCR dennoch niedriger ist: eine Dissoziationskonstante K_d , von 10^{-6} bis 10^{-7} beim TCR im Vergleich zu 10^{-9} beim BCR (COLLINS und FREILINGER 1998).

Eine Ausnahme stellt dabei der neue TCR/pMHC-II-Komplex dar: Obwohl die Ausdehnung des kontaktierten Gebiets derjenigen der Kl. I-Komplexe entspricht, ist die Affinität hier dennoch sehr hoch aufgrund einer viel höheren Komplementarität und einer doppelt so hohen Anzahl an Kontakten zwischen TCR und pMHC (REINHERZ et al. 1999).

Die Bindung des TCR an pMHC zeichnet sich des weiteren durch eine sehr langsame Kinetik aus: Verglichen mit Zell-Zell-Interaktionsmolekülen ähnlich geringer Affinität weist er nicht nur eine schnelle Dissoziation, sondern vor allem eine langsame Assoziation auf (WILLCOX et al. 1999). Außerdem auffällig im Vergleich zu den hochspezifischen Antikörpern ist die sehr hohe Kreuzreaktivität: ein TCR kann produktiv mit ca. 10^6 verschiedenen MHC-assoziierten Nonamerpeptiden interagieren (MASON 1998).

Charakteristisch für eine TCR/pMHC-I-Bindung ist also die weiträumige Ausdehnung der kontaktierten Flächen, deren geringe Komplementarität und die langsame Kinetik der Interaktion.

1.4.4 Folgen der TCR/pMHC-Interaktion.

Diese eine Interaktion zwischen Rezeptor und spezifischem Liganden kann – je nach innerer und äußerer TC-Umgebung – ganz unterschiedliche Auswirkungen haben. Hier soll nur kurz auf die wichtigsten Stadien dieser Interaktion während der TC-Reifung und in der reifen T-Zelle eingegangen werden.

1.4.4.1 TCR/pMHC-Interaktion während der TC-Entwicklung.

Schon während der thymischen Reifung kommt es zur Interaktion mit MHC-Molekülen:

Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark zunächst in den subkapsulären Cortextbereich des Thymus einwandern, zählen zunächst zu den DN (doppelt negativ)¹⁰-Thymozyten. Sie lassen sich anhand der CD44- und CD25-Expression in vier Stadien unterteilen; im Stadium III beginnt das TCR β -Kettenrearrangement. Für die α -Kette wird zunächst ein Ersatz eingesetzt, die preT α -Kette. Kann die β -Kette mit dieser Ersatzkette paaren, wird ein funktioneller Vorläufer-TCR (pre-TCR) an der Zelloberfläche exprimiert, der auch schon zur Signaltransduktion fähig ist. Die Notwendigkeit eines Liganden-Kontakts (MHC) in diesem Stadium ist noch unklar. Das pre-TCR-Signal leitet eine starke Proliferation und die allelische Exklusion des β -Kettenlocus ein (VON BOEHMER et al. 1999).

Zum Ende des nachfolgenden DN-IV-Stadiums hin beginnt das α -Kettenrearrangement. Über ein kurzes ISP-Stadium (engl. immature single positive: noch unreifer einzelpositiver Thymozyt), in dem zunächst der CD8-Korezeptor exprimiert wird, wird durch die nachfolgende CD4-Expression das DP-Stadium (doppeltpositiv) eingeleitet. Die DP-Thymozyten sind klein und tragen auf ihrer Oberfläche nur wenige TC-Rezeptoren, deren Expression nach dem ersten α -Kettenrearrangement im DP-Stadium beginnen konnte.

Im DP-Stadium finden die positive und die negative Selektion statt: Die positive Selektion verlangt, daß der Thymozyt funktionell ist und Selbst-MHC überhaupt erkennt – eine notwendige Voraussetzung für seine späteren Aufgaben. Dafür führt er fortwährend α -Kettenrearrangements durch. Durch Entstehung eines „funktionellen“ – Selbst-pMHC erkennenden – Rezeptors, kommt es zu einem TCR-Signal. Dieses Signal bewirkt durch Induktion von Überlebensfaktoren die Umgehung der sonst nach drei bis vier Tagen unausweichlichen Apoptose. Eine positive Selektion findet vor allem bei Bindung an corticale Epithelzellen statt.

Aber nicht nur die Erkennung von Selbst-MHC ist eine Voraussetzung für das Überleben des Thymozyten, sondern die Interaktion mit Selbst-pMHC darf auch nicht zu stark sein: Durch die negative Selektion, die besonders durch Interaktion mit Makrophagen und Dendritischen Zellen an der corticomedulären Schranke und mit Epithelzellen der Medulla vermittelt wird, sterben Thymozyten, die Selbst-pMHC zu stark binden. Das führt zur Eliminierung autoreaktiver Zellen (AMSEN und KRUISBEEK 1998; JAMESON und BEVAN 1998).

Die Art der MHC-Interaktion – beeinflusst durch die Konzentration und die Art der spezifischen Peptide und die Kinetik der Interaktion – ist ausschlaggebend für das Überleben von Thymozyten (AMSEN und KRUISBEEK 1998).

¹⁰Negativ bzw. positiv wird hier immer bezüglich der Zelloberflächenmarker CD4 und CD8 verwendet.

Im Laufe der Selektionsprozesse reguliert der Thymozyt die Expression seines TCR hoch und verliert die Expression eines seiner Korezeptoren CD4 oder CD8. Die MHC-Klassen-Spezifität des TCR muß dabei zu dem noch vorhandenen Korezeptor passen, sonst kommt es wiederum zum Zelltod. Ein Thymozyt, der allen diesen Anforderungen genügt, befindet sich dann als SP (einzelpositiver Thymozyt) in der Medulla und kann als reife, aber noch naive T-Zelle in die Peripherie entlassen werden (SEBZDA et al. 1999).

Eine TCR/pMHC-Interaktion mittlerer Affinität ist also eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung reifer T-Zellen; sie formt das TC-Repertoire durch Ausmerzungen von sinnlosen und autoreaktiven T-Zellen.

1.4.4.2 TCR/pMHC-Interaktionen der reifen T-Zelle.

Für das Überleben einer naiven T-Zelle in der Peripherie ist der ständige Kontakt mit Selbst-pMHC nötig. Bei adoptivem Transfer von CD8-T-Zellen aus TCR-transgenen Mäusen in bestrahlte Empfängertiere (die dadurch frei von Lymphozyten sind) ist die Expression des cognaten MHC im Empfängertier eine Voraussetzung für das Weiterleben der transferierten Zellen (TANCHOT et al. 1997; ERNST et al. 1999; VIRET et al. 1999). Eine schwache kontinuierliche TCR/pMHC-Interaktion in der Peripherie ist also notwendig, damit die T-Zellen dort überdauern können.

Aktivierung einer naiven T-Zelle findet statt, wenn sie – z.B. bei einer Infektion – auf ihr cognates Antigen trifft. Hier kann es zu einer hochaffinen Interaktion zwischen TCR und pMHC kommen, da der Selbst-MHC fremde, also im Thymus nicht vorhandene, Peptide präsentiert. Eine T-Zelle, die daraufhin – durch Interaktion mit dem cognaten Liganden, dem Agonisten, – eine hochaffine Interaktion registriert, wird aktiviert. Dabei konnte gezeigt werden, daß Agonisten sich von partiellen Agonisten oder Antagonisten vor allem in der Halbwertszeit der Interaktion zwischen TCR und pMHC unterscheiden (LORD et al. 1999; KERSH et al. 1998).

Die Ligation des TCR mit einer bestimmten Halbwertszeit der pMHC/Interaktion alleine reicht zur Aktivierung einer naiven T-Zelle nicht aus. Sie führt sogar zur Anergie (Inaktivierung der Zelle). Nur die Kombination der starken TCR-Ligation mit einem zusätzlichen kostimulatorischen Signal, meist über die Interaktion von CD28 auf der T-Zelle und CD80/CD86 auf der Antigenpräsentierenden Zelle (APC) bewirkt, daß die T-Zelle aktiviert wird, proliferiert und ihre Effektorfunktionen ausüben kann.

Das kostimulatorische Signal kann als eine Art Gefahrensignal angesehen werden: Dendritische Zellen (DCs), die potentesten APCs, erhöhen ihre kostimulatorische Aktivität, wenn sie durch einen ihrer Rezeptoren, die bakterielle

oder virale Substanzen erkennen, eine Infektion registrieren. Daraufhin beginnen sie mit der Hochregulierung der Expression von CD80/CD86 und MHC Kl. I/II und werden so fähig, antigenspezifische CD4-T-Zellen zu aktivieren (HEATH und CARBONE 1999). Rückwirkend können die T-Helferzellen dann über die CD40L/CD40-Interaktion die DCs kompetent machen, auch zytotoxische T-Zellen in den Effektorstatus zu überführen, die eine „CD4-TC-Hilfe“ meist zur Aktivierung benötigen (SCHOENBERGER et al. 1998). So muß die Interaktion der APCs mit CD4- und CD8-T-Zellen nicht gleichzeitig stattfinden.

In der Peripherie ist also ein kontinuierliches schwaches TCR-vermitteltes Signal für das Überleben der naiven T-Zellen wichtig, wohingegen ein starkes Signal zusammen mit Kostimulation zur Aktivierung führt.

1.4.4.3 Alloreaktion

Ein Spezialfall der Aktivierung einer naiven T-Zelle in der Peripherie ist die Alloerkennung: die Erkennung nicht eines fremden Peptidantigens, sondern eines fremden MHC-Moleküls¹¹.

Dieser Spezialfall kommt unter natürlichen Umständen nicht vor, ist aber ein großes Hindernis bei Organtransplantationen, da hier nicht – wie in einer Reaktion auf ein fremdes Antigen – eine von 10^5 T-Zellen reagiert, sondern 1-10 % der T-Zellen (DANIEL et al. 1998; MASON 1998; ZERRAHN et al. 1997).

Es gibt mehrere Gründe für das Ansprechen von ca. 1.000-mal mehr TC-Klonen in der Alloreaktion: Wie in Abschnitt 1.4.1 erklärt wurde, macht der TCR mehr Kontakte zum MHC als zum Peptid, hauptsächlich über die keimbahnco-dierte CDR1- und CDR2-Schleifen, die eine Präaffinität zum MHC besitzen. Ein fremder MHC kann sich nun in vielen vom TCR erkannten Aminosäuren von dem eigenen unterscheiden – vgl. auch Abbildung 1.5 –, und dadurch werden sehr viele TCR-Interaktionsstellen verändert, wohingegen bei Verwendung eines anderen Peptids weniger TCR-Interaktionsstellen betroffen wären (GARBOCZI und BIRDSON 1999).

Des weiteren präsentiert ein anderes MHC-Molekül die gleichen Peptide in einer anderen Konformation (indem eine Tasche z.B. tiefer ist und damit eine Aminosäure weiter in der Grube verborgen ist) und bindet ein anderes Peptidspektrum mit vielen neuen Peptiden. Leichte Verschiebungen der MHC α -Helices bei Bindung anderer Peptide wurden auch beschrieben (MADDEN 1995).

So ist es also verständlich, daß bei Wahrnehmung eines fremden MHC in der Alloreaktion viel mehr TC-Klone aktiviert werden als bei Wahrnehmung fremder Peptide in einer Infektion.

Allerdings gibt es noch keinen Kristall mit TCR und Allo-MHC; die Relevanz

¹¹Allo- bedeutet aus einem genetisch anderen Individuum der gleichen Art.

des Beitrags von Peptid- bzw. MHC-Kontakten für die Alloerkennung ist damit noch in der Diskussion (DANIEL et al. 1998; SPEIR et al. 1998; FREILINGER und MCMILLAN 1996).

1.5 Vorarbeiten und Zielsetzung dieser Arbeit.

Ein essentielles Problem der Immunologie ist das Verständnis der T-Zell-Aktivierung. Sie zu begreifen, ermöglicht es, Infektionen besser zu verstehen und Immunisierungsstrategien zu entwickeln, die fähig sind, auch ein TC-Gedächtnis aufzubauen. Es hilft, Autoimmunkrankheiten (Kreuzreaktivität) besser zu charakterisieren und dadurch womöglich ihre schädlichen Auswirkungen abzuschwächen, genau wie die Abstoßungsreaktion gegen Organtransplantate (Alloreaktion).

Wie dargelegt, ist die TCR/pMHC-Interaktion das wichtigste Moment der TC-Aktivierung.

Daher war es naheliegend, eine spezielle Variante der TCR/pMHC-Interaktion, die in unserem Labor gefunden wurde, näher zu charakterisieren: Es wurde eine präferentielle Interaktion eines TCRV α -Segments mit dem MHC der Lewis.1F-Ratte (RT1^f) gefunden, und zwar sowohl in der positiven thymischen Selektion als auch in der Alloreaktion:

In der Lewis.1F-Ratte (LEW.1F) verwenden 12-14 % der CD8-T-Zellen das V α 8.2-Segment (AV8S2). Das ist eine ungefähr achtfache Überselektion gegenüber dem unbeeinflussten Erwartungswert, der auch in anderen MHC-congenen¹² Rattenstämmen beobachtet werden kann (TORRES-NAGEL et al. 1994)¹³. Ein derartiges Ausmaß an Überselektion konnte sonst bis jetzt nirgends beschrieben werden.

Wie durch Rückkreuzung der LEW.1F-Ratte mit der LEW-Ratte und Analyse des Prozentsatzes der V α 8.2 exprimierenden CD8-Zellen gezeigt werden konnte, ist die Ursache dafür eine Überselektion in der positiven thymischen Selektion (TORRES-NAGEL et al. 1994).

Interessanterweise kann man eine präferentielle Expansion von V α 8.2-T-Zellen auch in der Alloerkennung des LEW.1F-MHC beobachten. Das erstaunt besonders, da die TCR/pMHC-Interaktion in der thymischen Selektion eine niedrigere Affinität verlangt als die Aktivierung einer naiven T-Zelle, wie es in der Alloreaktion geschieht. Nach RT1^f-Allostimulierung exprimieren ca. 6 % der CD8-Blasten V α 8.2, davor hingegen nur 2 %¹⁴.

¹²Congene Stämme unterscheiden sich ausschließlich im MHC voneinander.

¹³Da es bei der Ratte ca. 63 (TORRES-NAGEL et al. 1998) TCRV α -Segmente gibt, würde bei einer nicht beeinflussten, zufälligen und gleichmäßigen Expression aller V α -Segmente jedes in 1,6 % aller T-Zellen exprimiert werden.

¹⁴Blasten sind Zellen, die - im Fall der Alloreaktion durch Allo-MHC-Erkennung - aktiviert

Wie durch spätere Untersuchungen gezeigt werden konnte, gibt es keinen Einfluß beteiligter V β -Segmente (zufällige Verteilung) bei der Überselektion in der positiven Selektion oder Alloreaktion. Bei den RT1.A^f-alloreaktiven AV8S2-benutzenden CD8-T-Zellen jedoch konnte eine eingeschränkte Benutzung von CDR3/J α -Segmenten im Vergleich zu den durch thymische Selektion erzeugten gezeigt werden (TORRES-NAGEL et al. 1997).

Diese Überselektion wird unter den acht getesteten MHC-congenen Rattenstämmen nur in der LEW.1F-Ratte beobachtet, die den f-Haplotyp trägt.

Der f-MHC (RT1^f) scheint ausschlaggebend zu sein und, da die Überselektion nur im CD8-Kompartiment stattfindet, vermutlich ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül (RT1.A^f).

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war es daher, das A^f-Molekül zu klonieren, es zu charakterisieren und zu zeigen, daß es für die präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen verantwortlich ist. Des weiteren schien eine Kartierung der verantwortlichen Aminosäuren erstrebenswert. Damit sollten Kontaktpunkte zwischen TCR und MHC (für die Alloreaktion) definiert werden und damit ein Beitrag zum Verständnis der Allo-MHC-Erkennung geleistet werden.

wurden und daraufhin Proliferation und Differenzierung initiierten. Phänotypisch sind sie aufgrund ihrer Größenzunahme identifizierbar.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenten

2.1.1.1 Chemikalien

Azid	Merck
CaCl ₂	Roth
Chloroquin	Sigma
ConA (Cocavalin A)	Roth
DEAE-Dextran	Pharmacia
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
DMSO	Sigma
E ₈₊	Invitrogen
Ethanol	Applichem
Ethidiumbromid	Roth
HEPES	Roth
Isoamylalkohol	Ferak
LB	Gibco
Methyl α -mannopyranosid	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Penizillin/Streptomycin	Gibco
Phenol; TE-gesättigt (p _H 7,5-8)	Roth
Phenol; H ₂ O-gesättigt (p _H 4,5-5)	Roth
Polybren (Hexadimithrinbromid)	Sigma
RNAasin	Gibco
Zeozin	Invitrogen

2.1.1.2 Puffer und Lösungen

Alsevers:	4,2 g NaCl 8,0 g NaZitrat 20,5 g Glukose ad pH 6,1 (Zitronensäure) ad 1l mit dH ₂ O
Ampizillin:	100mg/ml dH ₂ O 0,2 µm Filter
ATV:	8,0 g NaCl 0,27 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,1 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 1,25 g Trypsin 1,25 g Na ₂ -EDTA ad 1l mit dH ₂ O und 0,2µm Filter
BSS: Salzlösung (balanced salt solution)	1Vol BSS 1 (10-fach) 1Vol BSS 2 (10-fach) 8 Vol dH ₂ O
BSS I:	10 g Glukose 0,6 g KH ₂ PO ₄ 2,3 g Na ₂ HPO ₄ 0,1 g Phenolrot ad 1 l mit dH ₂ O, autoklavieren
BSS II:	1,86 g CaCl ₂ 4,0 g KCl 80 g NaCl 2,0 g MgCl ₂ 2,0 g MgSO ₄ ad 1l mit dH ₂ O, autoklavieren

BSS/BSA: BSS/Rinder-Serumalbumin (bovine serum albumine)	BSS + 0,2% BSA
Chloroquin:	60 mg/ml in dH ₂ O 0,2 µl Filter
DEAE-Dextran:	100 mg/ml in PBS Autoklavieren bei 4° C aufbewahren
DMEM: Pyruvat Medium	500 ml DMEM (41966-029) 50 ml SC
DMEM: mit Glutamax	500 ml DMEM (32430-027) 50 ml SC
E₈⁺:	600 mM TrisHCl 150 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM MgCl ₂ pH ad 9,0
Formaldehydpuffer:	15% Formaldehyd 50% Formamid 10% 10x MOPS vor Gebrauch 1 µl/ml 10 mg/ml EtBr zufügen
Formamidpuffer:	0,5% Bromphenolblau 0,5% Xylencyanol 80% Formamid 10 mM EDTA
2xHeBS:	1 g HEPES 1,6 g NaCl 0,025 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 0,074 g KCl 0,2 g Glukose pH ad 7,05 ad 100 ml mit dH ₂ O, 0,2 µm Filter

LB:	20 g LB Broth Base (Gibco) auf 1 l mit dH ₂ O
α-Methymannosid:	0,2g/ml in BSS
10x MOPS:	400 mM MOPS 100 mM NaAzetat 10 mM EDTA pH 7,0 Lichtgeschützt aufbewahren
Polybren:	800 µg/ml in dH ₂ O
PBS:	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 2,0 g KH ₂ PO ₄ 1,67 g CaCl ₂ 1,0 g MgCl ₂ 0,1 g BSA ad 1 l mit dH ₂ O
PBS/BSA/Azid:	0,2% BSA 0,02% NaN ₃ in PBS
Puffer A:	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 M EDTA 0,1 M EGTA
Puffer B:	10 mM TRIS pH 7,5 7 M Harnstoff 1% SDS 0,3 M NaAzetat 20 mM EDTA
RPMI⁺:	500 ml RPMI 1640 (Gibco) 40 ml SC

SC:	500 ml Foetales Kälberserum (Pansystem)
Supplement	30' 56 °C
(supplement complete):	50 ml MEM non essential amino acids 100x (Gibco)
	50 ml 100mM NaPyruvat (Gibco)
	50 ml 1.000 U/ml Penizillin-Streptomycin (Gibco)
	5 ml 50 mM 2-Mercaptoethanol
	2,95 g Glutamin
	0,2 µm Filter
shamIg:	150 µg/ml shamIg
	1,59 g Na ₂ CO ₃
	2,93 g NaHCO ₃
	pH ad 9,5 (NaOH)
	ad 1 l mit dH ₂ O
TAC:	20 mM TRIS
	0,83% NH ₄ Cl
	pH 7,2
	0,2 µm Filter
50x TAE:	242 g Tris
	57,1 ml Essigsäure
	100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
	ad 1 l mit dH ₂ O

2.1.1.3 Serologische Reagenten

Wenn nicht anders angegeben handelt es sich immer um monoklonale Maus-antikörper gegen Ratte-Epitope.

Name	Epitop	Referenz/Firma
R73	TCR	(HÜNIG et al. 1989)
3.4.1	CD8 β	(TORRES-NAGEL et al. 1997)
H100-5.28 (mαm)	K ^k /D ^k	Hämmerling
JJ319	CD28	(TACKE et al. 1995)
G177	V α 8.2	(TORRES-NAGEL et al. 1997)
3H5	CD80	(MAEDA et al. 1997)
2.4G2 (rαm)	Fc γ RII/III	Pharmingen
NMIgG	-	Sigma
RIgG (r)	-	Sigma
L180/1 (mαsh)	Schaf-LFA-1	(HÜNIG 1985)
shαmIg	Maus-Ig	Boehringer
dαmPE	Maus-Ig	Jackson
dαrPE	Ratte-Ig	Jackson
shαmIg	Maus-Ig	Boehringer

Antikörper gegen Ratte MHC Kl. I

Name	Spender	erkannte Haplotypen	Immuni-sierung	Referenz
F16.4.4	Maus	(a+, f+, 2f+, l+)	-	Joly, Butcher
Ox18	Maus	(a+, f+, 2f+, l+)	-	(FUKUMOTO et al. 1982)
JY1/75	Ratte	a+, f+, (2f-), l+	AO anti DA	(BUTCHER 1987)
JY1/232	Ratte	a+, f+, l+	AO anti DA	(BUTCHER 1987)
R2/15S	Ratte	a+, f+, (2f-), l+	AO anti DA	(BUTCHER 1987)
GN3/2	Ratte	(a+, f+, 2f+, l-)		Joly, Butcher
MAC-30	Maus	a+, (f+, 2f-, l-)	PVG-RT1 ^u anti PVG.R8	(BUTCHER 1987)

Name	Spender	erkannte Haplotypen	Immuni-sierung	Referenz
JY1/132	Ratte	a+, f+, (2f-), l-	AO anti DA	(BUTCHER 1987)
JY3/50	Ratte	a+, f+, (2f-), l-	AO anti DA	(BUTCHER 1987)
YR1/146	Ratte	a+, f+, (2f-), l-	LOU/Iap anti DA	(BUTCHER 1987)
5F3A	Ratte	(a-, f+, 2f+, l+)		Günther
YR2/69	Ratte	a-, f+, (2f+), l+	LOU/Iap anti RT1 ^o stock	(BUTCHER 1987)
6/30/6	Maus	a+, f-, (2f-), l-	LEW.1U anti LEW.1A	(BUTCHER 1987)
31/13	Ratte	a+, f-, (2f-), l-	LEW.1U anti LEW.1A	(BUTCHER 1987)
I.1.69.1	Maus	(a-, f-, 2f-, l+)	-	(KIMURA und WILSON 1984)

AO: u-Haplotyp: A^u, B^u, D^u, C^u

DA: a-Haplotyp: A^a, B^a, D^a, C^a

LEW.1A: a-Haplotyp: A^a, B^a, D^a, C^a

LEW.1U: u-Haplotyp: A^u, B^u, D^u, C^u

LOU/Iap: u-Haplotyp: A^u, B^u, D^u, C^u

PVG-RT1^u: u-Haplotyp: A^u, B^u, D^u, C^u

PVG.R8: r8-Haplotyp: A^a, B^u, D^u, C^u

RT1^o stock: o-Haplotyp: A^d, B^a, D^a, C^{?1}

Diese Angaben wurden entnommen aus (JOLY et al. 1994).

¹Das Fragezeichen bedeutet, daß der C-Locus in den o-Haplotyp-Ratten noch unbekannt ist.

2.1.1.4 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer stammen von MBI:

*Bam*HI *Eco*RI
*Pvu*II *Xba*I
*Pma*CI bzw. *Eco*72I
*Sda*I bzw. *Sse*8387I
*Bpu*1102I

Enzyme zur Klonierung und andere DNA-Klonierungsreagentien:

Panscript-/ Powerscript- DNA-Polymerase PAN
 T4-Ligase MBI
 calf intestine alkaline phosphatase MBI
 Taq-Polymerase MBI
 Superscript, Reverse Transkriptase Gibco
 Nukleotide Promega
 DNA-Marker (1 kb ladder) Gibco

2.1.2 Vektoren

Name	Resistenz	Größe	Bemerkung	Referenz
pCMUIV	Ampizillin/-	4,0 kb	SV40-Enhancer, α g1-Promotor	(JOLY und OLD- STONE 1991b; JOLY und OLDSTONE 1991a)
pLEN/- MCS	Ampizillin/ Neomycin	6,1 kb	5' und 3' LTR, EMCV-IRES	I. Berberich
pLBE	Ampizillin	6,1 kb	5' und 3' LTR, EMCV-IRES, GFP	I. Berberich
pHIT/- EGFP	Ampizillin	8,8 kb	CMV-Promotor, SV40 Origin, 3'LTR, EGFP	(BUEHLER und MULLIGAN 1996)
pSVneo	Ampizillin/- Neomycin	5,9 kb	SV40 Origin	J.Mol. Appl.Gen. (1982) 1:327-341
pHIT60	Ampizillin		gag, pol	(BUEHLER und MULLIGAN 1996)
pHIT123	Ampizillin		env	(BUEHLER und MULLIGAN 1996)
pEGZ/- MCS	Zeozin			I. Berberich

Im Rahmen dieser Arbeit generierte/erhaltene Konstrukte:

pCMUIV: A^a, A^f, A2^f, A1^o, A1/24(1), H-a/f, H-f/a

pLEN: A^a, A^f, A2^f

pHIT/EGFP: H-a/f, H-f/a, A^{fSD}

A^a, A1^o und A2^f in pCMUIV wurden freundlicherweise von E. Joly zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3' (Nukleotidanzahl)	ds/us	Bindungs- stelle	Restrik- tions- schnitt- stelle	Referenz
EJus	TGC TGC TTG GCG GCC GCC CTG G (22)	us	zu Beginn von Exon II	<i>NotI</i>	(JOLY et al. 1995)
EJds	GCT CTA GAG TCC AGG CAG CTG TCT TCA (27)	ds	am Stopco- don	<i>XbaI</i>	(JOLY et al. 1995)
Ods	CCA GGG CCC AGC ACC TCA GG (20)	ds	Exon IV	-	E. Joly, un- veröffent- licht
Mus	CGG GAG GGG CCG GAG TAT TGG GA (23)	us	Exon II	-	E. Joly, un- veröffent- licht
W001c	CAT GAT CGA ATT CAC GCG TCT AGA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN ¹ (51)	cDNA	an polyA	<i>XbaI</i>	(WANG et al. 1996)
W002us	GTC CGG GW ¹ T CTC AGA TGG GGG C (22)	us	am Transla- tionsstart	-	(WANG et al. 1996)
W004us	ATA AGA AGC GGC CGC ATG TCC GGG W ¹ TC TCA GAT GGG GGC (39)	us	am Transla- tionsstart	<i>NotI</i>	diese Arbeit

Name	Sequenz 5'→3' (Nukleotidanzahl)	ds/us	Bindungs- stelle	Restrik- tions- schnitt- stelle	Referenz
W003ds	ATG ATC GAA TTC ACG CGT CTA GA (23)	ds	am Stopco- don	<i>XbaI</i>	(WANG et al. 1996)
EJds/- BamHI	TCA TGG ATC CAC TCC AGG CAG CTG TCT TCA (30)	ds	am Stopco- don	<i>BamHI</i>	diese Arbeit
Kozsus	TAG AAT TCG CCA CCA TGG GGG CGA TGG CAC (30)	us	am Transla- tionsstart	<i>EcoRI</i>	diese Arbeit
BM005ds	GTC TCC TCC TCC CAA TAC TC (20)	ds	Exon II	-	diese Arbeit
BM006us	GAG GAG GAG GAA GAG AAA CAC (21)	us	Exon V	-	diese Arbeit
BM007ds	GCC CTC GCT CTG GTT GTA GTA G (22)	ds	Exon II	-	diese Arbeit
BM008us	ACG TGG GGT CGG ACG GG (17)	us	Exon II	-	diese Arbeit
BM009us	ACC CAG GAC ATG GAG CTT (19)	us	Exon IV	-	diese Arbeit

2.1.4 Peptide

Das OVA-Peptid **AASVSEEFR** wurde aus der Sequenz des Ovalbuminproteins entnommen. Es enthält die von A^f voraussichtlich verlangten Ankeramino-säuren. Synthetisiert wurde es am Lehrstuhl für Physiologische Chemie mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Palm.

¹V = A, G, C

N = A, G, C, T

W = A, T

2.1.5 Bakterien

Name	Genotyp	Referenz/Firma
DH5α	supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hs-dR17 recA ⁻ endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(HANAHAN 1983)
TopF^c	recA lacZ Δ M15 endA lacI ^q mciA ⁻ , -CB. mar,hed12	Invitrogen

2.1.6 Zelllinien und Hybridome

Zelllinien

Name	Eigenschaft	ATTC-Nummer ¹ bzw. Referenz
L929	Fibroblasten Tumorzelllinie aus der Maus	CCL-1
P815	Mastzelllinie aus der Maus	TIB-64
P815-rCD80	Ratte-CD80-transfizierte Maus-Mastzellen	(MAEDA et al. 1997)
P815-rCD86	Ratte-CD86-transfizierte Maus-Mastzellen	(MAEDA et al. 1997)
cos	Transformierte Affenzellen,..	CRL-1650
293T	transformierte humane embryonale Nierenzellen	CRL-1573
RMA-S	TAP-defiziente Maus-Zelllinie(stammt von RBL-5)	(TOWNSEND et al. 1989; POWIS et al. 1991)

Hybridome

Name	Fusion	Quelle
THO64	LEW.1FxBW	R. Mitnacht-Kraus
THO35/1	LEW MBP spezifische TC-Linie x4G4	A. Asmuß
THO53/4	LEW MBP spezifische TC-Linie x4G4	A. Asmuß

¹American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852

In dieser Arbeit generierte Zelllinien und Hybridome

eingebrahtes Gen/Zelllinie	P815-rCD80	L929	RMA-S	THO35/1	THO53/4
A ^a	+	+	-	+	+
A ^f	+	+	+	+	+
A2 ^f	+	+	-	+	-
A ^l	-	+	-	-	-
A1 ^o	-	+	-	-	-
H-a/f	+	+	-	-	-
H-f/a	+	+	-	-	-

2.1.7 Versuchstiere

LEW-Ratte (RT1^l)

LEW.1F-Ratte (RT1^f)

DA-Ratte (RT1^a)

MRL/Sprague-Dawley-Auszucht-Ratte (RT1^f)

Aus den Tierbeständen des Instituts für Virologie und Immunbiologie, Würzburg

2.1.8 Programme

Mac: Mac Vector, CELLQuest, Sequenzenavigator, Power Point, Mac Draw, Fetch, Rasmol, Excel (Microsoft), Word (Microsoft), Cricket Graph, Netscape Communicator, Versaterm Pro

Linux: Applix Spreadsheet, Applix Word, Emacs, L^AT_EX, X-fig, rasmol

Unix: GCG: Wisconsin Sequence Analysis Package (RZ): Fetch, LineUp, Look-Up, PileUp, Pretty, Reformat, SeqEd, StringSearch, Translate

2.1.9 Kits

Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi)

Quiaprep-spin Plasmid Kit

Quiaquick PCR Purification Kit

CD8-Säulen

Gel Extraction Kit

Quiagen

Quiagen

Quiagen

Cedarlane

Jetsorb

2.1.10 Geräte

FACScan

FACSort

DNA Thermal Cycler

Compugamma (γ -Counter)

Elektroporator II

Zentrifugen

Certomat (Bakterienschüttler)

Brutschrank

Laminar Flow Hood

BD

BD

Perkin Elmer

Wallac

Invitrogen

Heraeus, Eppendorf

Bachofer

Heraeus

Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 RNA-Isolierung

Beim Arbeiten mit RNA sollten grundsätzlich Handschuhe, RNA-Plastik und DEPC-Wasser verwendet werden. Bis zur Phenolextraktion wurden für dieses Protokoll alle Handlungen im Kühlraum durchgeführt.

Die gewünschten Zellen (Ratte *ex vivo* oder THO64) wurden auf 10^7 pro Ansatz eingestellt und in einem Reaktionsgefäß in PBS 15 Sekunden bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 μ l Puffer A resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden 20 μ l 10% NP-40 zugegeben, dieses Gemisch 10 Sekunden lang gevortext und anschließend 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß pipettiert, das 400 μ l Puffer B und 600 μ l Phenol²/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) enthielt. Danach wurde der Ansatz gevortext und für 10 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase des Reaktionsgemisch wurde in ein neues Gefäß überführt, das gleiche Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) zugegeben und es wurde wiederum gevortext und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dazu das 2,5-fache Volumen an 100%igem Ethanol geben, die Lösung durch Invertieren gemischt und bei 18 °C und 15.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols wurde mit 70%igem Ethanol³ gewaschen, die gefällte RNA getrocknet und in einem geeigneten Volumen DEPC-Wasser aufgenommen.

Die RNA wurde – nach einer Konzentrationsbestimmung – bei -80 °C eingefroren oder sofort zur cDNA-Synthese eingesetzt.

2.2.1.2 cDNA-Synthese

2 μ g RNA
8 μ l 5x-Puffer
4 μ l dNTPs (2,5 mM)
2 μ l Primer W001c (0,1 μ g/ μ l)
1 μ l RNasin (40U/ μ l)
0,5 μ l Reverse Transkriptase
ad 40 μ l mit DEPC-H₂O

²Wasser gesättigt

³verdünnt in DEPC-Wasser

Nach dem Zusammenpipettieren der aufgelisteten Reagenten wurde die Mischung für 10 Minuten bei 18 °C und dann eine Stunde bei 36 °C inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C inaktiviert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet (Abschn. 2.2.1.6).

2.2.1.3 Gelelektrophorese

Für Agarosegele wurden 1%ige Gele verwendet. Dafür wurde 0,5 g Agarose in 50 ml TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das Gel gegossen.

2.2.1.4 Restriktionsspaltung

Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellerangaben (MBI) durchgeführt.

2.2.1.5 Elution

Die Elution wurde mit dem Jetsorb Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.6 PCR

Plastikmaterial und H₂O wurde vor Gebrauch zur Spaltung evtl. vorhandener kontaminierender DNA mit UV-Licht bestrahlt.

PCR-Mix.	Taq-Mix:
9 µl E ₈₊	1,1 µl Taq Polymerase
10 µl DMSO	1 µl E ₈₊
1,2 µl W003ds	H ₂ O ad 10 µl
1,2 µl W004us	
11 µl dNTPs [2,5 mM]	
2 µl cDNA	
H ₂ O ad 90 µl	

Zunächst wurde der PCR-Mix hergestellt, schon in die Reaktionsgefäße auf Eis vorgelegt und mit Paraffinöl überschichtet. Anschließend wurde – ebenfalls auf Eis – der Taq-Mix vorpipettiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße in den 94 °C heißen Thermocycler gegeben, der diese Temperatur hält. Der Taq-Mix wurde unter die Paraffinölschicht pipettiert und folgendes Thermocycler-Programm gestartet:

$$\left. \begin{array}{l} 3' \quad 95^\circ\text{C} \\ 1' \quad 95^\circ\text{C} \\ 1' \quad 62^\circ\text{C} \\ 1' \quad 72^\circ\text{C} \\ 7' \quad 72^\circ\text{C} \\ \infty \quad 4^\circ\text{C} \end{array} \right\} \times 30$$

Anschließend wurden 10 μl des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.1.7 Phenolisierung

Zu 100 μl wässriger DNA-Lösung wurde die gleiche Menge an TE-gesättigtem Phenol gegeben, der Ansatz wurde gemischt und abzentrifugiert. Die Phenolphase wurde abgenommen und die wässrige Phase zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol gewaschen. Die DNA wurde danach gefällt und in dH_2O resuspendiert.

2.2.1.8 Transformation

Die Transformation wurde nach der Hitzeschockmethode ausgeführt: In 14 ml Blaukappenreaktionsgefäßen wurden 50 μl kompetente Bakteriensuspension mit bis zu 100 ng DNA von Quiagenqualität gemischt, 10 Minuten auf nassem Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden im 42 $^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad geschwenkt. Danach wurde sofort 1 ml Medium zugegeben und die Bakterien bei ca. 180 rpm und 37 $^\circ\text{C}$ für 45 Minuten durchgemischt, zentrifugiert, ausplattiert und über Nacht bei 37 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Kolonien weiter analysiert.

2.2.1.9 Ligation

Die Ligationen wurden mit der T4-Polymerase nach Herstellerangaben (MBI) durchgeführt.

2.2.1.10 Plasmidpräparation

Die Plasmid-DNA wurde entweder mit dem Quiagen-Plasmid-Kit nach Herstellerangaben gereinigt (zum Sequenzieren oder Klonieren) oder die DNA wurde durch eine Standard-Alkalische-Lyse gewonnen (zur *cos*-Zell-Transfektion und Restriktionsspaltung).

2.2.2 Immunologische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von ConA-Blasten.

Die Milzzellen (10^6 /ml) wurden in 50 ml RPMI⁺, 5 μ g/ml ConA aufgenommen und für zwei Tage in den Inkubator gestellt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, und das Pellet in 50 ml RPMI⁺, 20 mg/ml α -Methylmannosid aufgenommen und für 20 Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Die Zellen wurden mit BSS gewaschen und konnten anschließend für die RNA-Isolierung verwendet werden.

2.2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse

2×10^5 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt, mit PBS/BSA/Azid gewaschen, die Röhrchen mit Schwung entleert und die Restflüssigkeit durch Abtupfen entfernt. Der spezifische Antikörper wurde in sättigender Konzentration zugeben, die Zellen gevortext und 15 Minuten auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert.

Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen am FACScan analysiert.

2.2.2.3 Gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR)

2.2.2.3.1 MLR zur Herstellung von Effektoren für einen Zytotoxizitätstest. Ratten zweier verschiedener Haplotypen⁴ wurden geschlachtet. Die LN wurden entnommen, in eine Einzelzellsuspension überführt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Der ÜS wurde in ein neues Gefäß überführt und zweimal mit BSS/BSA gewaschen. Die Stimulatorzellen wurden mit bestrahlt (Cs, 2.000 rad) und gewaschen. Anschließend wurden jeweils 2×10^7 der Effektor- und Stimulatorzellen in eine kleine (50 ml) aufrechtstehende Zellkulturflasche in 15 ml RPMI⁺ geben. Am vierten Tag wurde 10 ml Medium ersetzt so daß eine IL-2 Endkonzentration von 100 U/ml erreicht wurde. Am fünften Tag wurden die Effektoren für einen Zytotoxizitätstest verwendet. Ggf. konnte eine Restimulation durchgeführt werden: Die Flasche wurden im Inkubator gelassen und – wenn nötig – verbrauchtes Medium durch frisches ersetzen. Am zehnten Tag wurden die Zellen geerntet und 5×10^6 davon gemeinsam mit neuen Stimulatoren (2×10^7) inkubiert. Die IL-2 Zugabe erfolgte an Tag 13 und der Zytotoxizitätstest an Tag 14.

2.2.2.3.2 MLR zur Analyse der selektiven Expansion von V α 8.2-exprimierenden CD8-T-Zellen.

⁴Meistens wurden LEW-Zellen als Effektorzellen verwendet und LEW.1F-Zellen als Stimulatoren.

MLR mit **Maus-Mastzellen (P815-rCD80)** als Stimulatoren:

LEW T-Zellen, die Effektoren, wurden mittels NW (Abschn. 2.2.2.8) oder CD8-Säule (Abschn. 2.2.2.9) gereinigt. 10^5 davon wurden zusammen mit der gleichen Menge an für eine Stunde MMC-inaktivierten Stimulatoren (Abschn. 2.2.2.4) in RPMI⁺ in eine Rundboden-96-Napfplatte pipettiert. Die Platte wurde für fünf Tage im Brutschrank belassen und anschließend wurde durch FACS-Analyse die selektive Expansion V α 8.2-positiver CD8-Zellen gemessen.

MLR mit **L-Zellen** oder **T-Zellhybridomen** als Stimulatoren:

Für diese Stimulatoren wurden 100 U/ml IL-2 während der fünf Tage Inkubationszeit zugegeben. Für MLRs mit THOs wurden 10^4 Stimulatorzellen pro Napf eingesetzt.

MLR mit **Ratten-LN-Zellen** als Stimulatoren:

Bei den Ratten-Zellen erfolgte die Inaktivierung mittels Bestrahlung (Cs, 2.000 rad). Eine MLR mit diesen Stimulatoren kann prinzipiell sowohl in 96-Napf-Rundbodenplatten wie auch in kleinen (50 ml) Zellkulturflaschen – wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben – durchgeführt werden. IL-2-Gabe ist hier möglich aber nicht notwendig.

2.2.2.4 Mitomycin C-Inaktivierung von Stimulatorzellen für eine MLR.

Nachdem die Zellen zweimal mit 37 °C warmem BSS gewaschen worden waren, wurden sie in 100 μ l BSS resuspendiert und 50 μ g/ μ l Mitomycin C dazu pipettiert (Handschuhe benutzen!). L-Zellen wurden für 2 Stunden inkubiert, P815-rCD80-Zellen für eine Stunde und THOs für 45 Minuten. Während dieser Inkubationszeit wurde alle 15 Minuten gevortext. Danach wurden die Zellen zweimal mit BSS/BSA und einmal mit RPMI⁺, 20 mM HEPES gewaschen und anschließend in einem geeignetem Volumen RPMI⁺, 20 mM HEPES resuspendiert.

2.2.2.5 Zytotoxischer Test

Beim Arbeiten mit radioaktiven Substanzen müssen die bekannten Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

10^6 Zielzellen (THOs, L-Zellen oder P815-rCD80-Zellen) wurden in 100 μ l RPMI⁺, 20 mM HEPES aufgenommen, 100 μ l Chromat (51 Cr) zugefügt und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C in ein Wasserbad gestellt.

Währenddessen wurden die Effektoren von Abschn. 2.2.2.3.1 in eine 96-Napf-Spitzbodenplatte vorpipettiert. Dafür wurden die Effektoren von 10^5 Zellen/Napf in Dreierstufen herunterverdünnt, wobei für jede Verdünnungsstufe Triplikate an-

gesetzt wurden. In jeweils drei Näpfe wurde NP-40, zur Ermittlung der Maximallyse, bzw. RPMI⁺, zur Ermittlung der Spontanlyse gegeben.

Nach der einen Stunde Markierung wurden die Zielzellen zweimal mit BSS/-BSA und einmal mit RPMI⁺, 20 mM HEPES gewaschen. 10⁶ der Zielzellen wurden in 10 ml RPMI⁺/HEPES aufgenommen, jeweils 100 μ l davon in die Effektor-, bzw. NP-40- oder RPMI⁺-Näpfe gegeben und die Platte für 4 Stunden in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden vorsichtig 100 μ l der Flüssigkeit in γ -Counter Röhrchen überführt, wobei das Pellet nicht aufgewirbelt werden darf. Die Röhrchen wurden im γ -Counter gemessen (Programm a, 5).

Auswertung des Zytotoxizitätstests:

$$\frac{\overline{Eff} - \overline{Spo}}{\overline{Max} - \overline{Spo}}$$

\overline{Eff} = Mittelwert der Triplikate für jedes Effektor-/Zielzellverhaltnis

\overline{Spo} = Mittelwert der Triplikate der spontanen Lyse

\overline{Max} = Mittelwert der Triplikate der maximalen Lyse

Mit dieser Formel wurde jeder Punkt der Abszisse (Effektor-/Zielzellverhaltnis) berechnet und so die prozentuale spezifische Lyse ermittelt.

Blockade des L-Zellkills.

Vor der Chrom-Beladung wurden die Stimulatoren mit H100-5.28 (K^k/(D^k)) in Sättigung in 0,5 ml BSS 30 Minuten unter mehrmaligem Invertieren auf Eis inkubiert. Dieses Gemisch wurde gewaschen und dann direkt mit Chrom beladen.

2.2.2.6 „Panning“

Von LEW-Ratten wurden Milz und LN entnommen, in eine Einzelzellsuspension überführt und nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Überstand gewaschen. Für die Milzzellen wurde eine TAC-Lyse durchgeführt (s. Abschn. 2.2.2.10). Aus den Erythrozyten depletierten Milzzellen und den Lymphknotenzellen wurden T-Zellen mittels einer NW-Säule (s. Abschn. 2.2.2.8) angereichert und dann gewaschen. Anschließend wurden die T-Zellen durch ein Vorpanning für 30 Minuten bei 4 °C weiter angereichert; die Platte darf dabei nie austrocknen. Die T-Zellen wurden sorgfältig abgespült und auf der G177-„Panning“-Platte eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde diese Platte ein- bis zweimal geschwenkt. Danach wurden ungebundene Zellen vorsichtig abgespült und für das R73-Panning aufgehoben. Die gebundenen – V α 8.2-positiven – Zellen wurden auf der Platte belassen, wobei 10 ml RPMI⁺, 5 % FCS, 100 U/ml

IL-2 und 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ JJ319 zugegeben wurde, und die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Mit den restlichen – V α 8.2-negativen – Zellen wurde beim R73-„Panning“ analog verfahren.

Nach drei Tagen wurden die Zellen durch heftiges Spülen mit einer Pasteurpipette von der Platte abgelöst, gewaschen und noch zwei Tage in RPMI⁺, 5 % FCS, 100 U/ml IL-2 und 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ JJ319 inkubiert. Anschließend wurden sie als Effektoren in einem Zytotoxizitätstest eingesetzt.

Beschichtung für das **Vorpanning**:

20 ml Beschichtungspuffer wurden über Nacht auf eine Platte geben. Vor Gebrauch wurde diese dreimal mit BSS gewaschen.

Beschichtung für das **R73-** bzw. **G177-Panning**:

10 ml shamIg wurde über Nacht bei 4 °C auf eine Platte geben. Am nächsten Morgen wurde die shamIg-Lösung wieder abgenommen und die Platte dreimal mit BSS waschen. Dann wurde in sättigender Konzentration der sekundäre Ak (G177 bzw. R73) in BSS verdünnt aufgetragen. Die Platten wurden für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert, wobei nach eineinhalb Stunden 5 % NRS zugegeben wurde. Vor der Verwendung wurden die Platten dreimal mit BSS gewaschen.

2.2.2.7 „Sortieren“ von V α 8.2-Zellen.

Wie in Abschnitt 2.2.2.3.1 beschrieben wurde eine MLR angesetzt. Nach fünf Tagen wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit G177 in BSS auf 1 ml aufgefüllt. Unter gelegentlichem Mischen wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte dieselbe Prozedur mit dem sekundären Antikörper (damPE). Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen in 10⁷/ml BSS aufgenommen und zum Sortieren gegeben. G177-positive wurden von G177-negativen Zellen getrennt und diese einzeln in RPMI⁺, 5 % FCS weiterinkubiert. Am neunten Tag wurden die Zellen restimuliert und nach weiteren 5 Tagen erfolgte der Zytotoxizitätstest.

2.2.2.8 Reinigung von T-Zellen durch eine Nylonwollsäule.

Für die Lymphknoten einer Ratte wurden 1,2 g, für die Milz 1,8 g Nylonwolle lose gezupft und eine Einmalspritze passender Größe damit gestopft. An die Kanülenseite der Spritze (ab jetzt Säule) wurde ein Schlauch angebracht, ihre „offenen“ Enden mit Alufolie abgedeckt und die Säule autoklaviert.

Am Tag der Verwendung wurde die Säule mit BSS gewaschen, Luftblasen entfernt und die Nylonwolle auf 10 ml/g Nylonwolle verdichtet. Schließlich wurde die Säule mit einem Volumen BSS/5%FCS gewaschen und – nachdem sie mit

der bereits autoklavierten Alufolie wieder abgedeckt wurde – für mindestens eine Stunde in den 37 °C-Raum gestellt.

Währenddessen wurden Lymphknoten bzw. Milzen entnommen und vorbereitet: Die Organe wurden durch ein Metallnetz gerieben, 10 Minuten in einem 15 ml Falcon-Röhrchen auf Eis gestellt und anschließend in ein neues Röhrchen überführt. Sie wurden zweimal mit BSS/BSA gewaschen und gezählt. 10^8 Zellen wurden in 1 ml 37 °C warmen BSS/5 % FCS aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Zellen die Säule ca. bis zur Hälfte durchlaufen hatten, wurde der Schlauch geschlossen und die Säule für 45 Minuten in den 37 °C-Raum gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 37 °C warmen BSS/5 % FCS eluiert und in einem auf Eis gekühltem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen.

2.2.2.9 Reinigung von CD8⁺-T-Zellen durch eine Säule.

Die Reinigung von CD8-positiven Zellen erfolgte mit Cedarlanesäulen entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.2.10 TAC-Lyse zur Entfernung von Erythrozyten.

Die Milzzellen wurden zentrifugiert und das Pellet trockengesaugt. Sie wurden in etwas TAC-Puffer zunächst resuspendiert und dann auf 10 ml TAC-Puffer/Milz aufgefüllt. Dieser Ansatz ruhte für 10 Minuten bei RT, wurde anschließend zentrifugiert und die Zellen in dem gewünschten Medium aufgenommen.

2.2.2.11 RMA-S-Peptidstabilisierungstest.

Am Vortag des Tests wurden 5×10^5 RMA-S-Zellen pro Ansatz bei 26 statt 37 °C in RPMI⁺, 5 % FCS und 20 mM Hepes angeimpft. Am nächsten Morgen wurden sie zweimal gewaschen und in 1,5 ml kaltem RPMI pro Ansatz ohne FCS aber komplementiert mit den anderen SC-Bestandteilen (5 ml MEM (100x), 5 ml NaPyr (10 mM), 5 ml P/S, 250 μ l β Mercaptoethanol (50 mM), 3 ml 5 % Gln) resuspendiert. Dazu wurden 50 μ M Peptid gegeben und es wurde gemischt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 26 °C wurden die Zellen für 4 Stunden auf 37 °C überführt. Danach wurden sie gewaschen und sofort zur FACS-Analyse weiter behandelt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Zellkultur

Gewöhnlich wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C, 100%iger Luftfeuchtigkeit und 5,4 % CO₂ in Zellkulturplastik kultiviert und unter sterilen Be-

dingungen unter einer Laminar Flow Hood gehandhabt.

293T-Zellen wurden in DMEM (Glutamax) unter Zugabe von 10% FCS und 600 μ l Penizillin/Streptomycin je 500 ml Flasche kultiviert und in Zellkultur-Petrischalen inkubiert. Cos-Zellen wurden in Haus-DMEM unter Zugabe von 50 ml SC und 18 ml NaHCO₃ kultiviert und in liegenden Zellkulturflaschen inkubiert. Alle anderen Zelllinien und Hybridome wurden in RPMI 1640 unter Zugabe von 50 ml SC kultiviert, dabei wurden L-Zellen in liegenden Zellkulturflaschen inkubiert und die übrigen Zelllinien und Hybridome in 24-Napf-Platten in Dauerkultur gehalten und für Experimente in Platten mit größerem Napfvolumen oder in liegenden Zellkulturflaschen inkubiert.

2.2.3.2 Transfektion von L-Zellen mit CaCl₂.

Transfektionsmedium:

500 ml Haus-DMEM

0,6 g HEPES⁵

50 ml FCS

18 ml NaHCO₃

5 ml 100 mM NaPyruvat

1 ml Penizillin/Streptomycin

L-Zellen wurden am Vortag zu 10-20%iger Bodenbedeckung angeimpft. Am Tag der Transfektion wurde das verbrauchte Medium durch Transfektionsmedium ersetzt, die Transfektionsmischung zugegeben und die Zellen wieder in den Inkubator gestellt. Nach 48 Stunden wurde mit der Selektion begonnen (für L-Zellen 0,3 mg/ml G418). Nach einigen Wochen waren die ersten Klone ausgewachsen.

Transfektionsmischung:

300 μ l 250 mM CaCl₂ mit 5 μ g DNA mischen. Unter heftigem Mischen 300 μ l 2x HeBS zugeben.

2.2.3.3 Transiente Transfektion von cos-Zellen mittels DEAE-Dextran und Chloroquin.

Transfektionsmedium:

500 ml Haus-DMEM

0,6 g HEPES

18 ml 5,6% NaHCO₃

5 ml 100 mM NaPyruvat

⁵HEPES in etwas Medium aufnehmen und mit einem 0,2 μ m Filter sterilfiltrieren.

1 ml Penizillin/Streptomycin

Am Vortag wurden 10^6 cos-Zellen pro 50 ml Zellkulturflasche angesät. Am Tag der Transfektion wurde mit 3 ml 37°C warmem Transfektionsmedium gewaschen (jeweils pro Flasche). 2,5 ml der DNA-Mischung wurden zugegeben, die Deckel fest zugeschraubt und die Flaschen für zwei Stunden in den Inkubator gestellt.

DNA-Mix:

2,5 ml Transfektionsmedium

2 μl Chloroquin

10 μl DEAE-Dextran

1 μg DNA

Alle im folgenden verwendeten Medien und Puffer waren auf 37°C vorgewärmt. Nach der zweistündigen Inkubation wurden die Flaschen jeweils mit 3 ml PBS gewaschen, für 2 Minuten 2,5 ml PBS/10 % DMSO zugefügt und sofort wieder mit 3 ml PBS gewaschen, das anschließend durch 3 ml Kulturmedium ersetzt wurde. Nach 48 Stunden wurde die Expression des Zielgens durch FACS-Messung überprüft.

2.2.3.4 Elektroporation von THO35/1 und P815-rCD80-Zellen.

Pro Ansatz wurden 10^6 konfluente Zellen geerntet, zweimal in RPMI^- gewaschen und in 250 μl RPMI^- aufgenommen. Die Zellen wurden blasenfrei in eine Küvette (Diodenabstand: 4mm) überführt und mit 10 μg DNA gut vermischt. Der Puls wurde bei 1.000 μF , ∞ Ohm und 200 V für RMA-S-Zellen, bzw. 250 V für THO35/1 und P815-Zellen gegeben und die Zellen sofort in 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in den Inkubator gestellt. Am folgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und am nächsten Tag wurde mit der Selektion begonnen.

2.2.3.5 Retrovirale Infektion von P815-rCD80- und RMA-S-Zellen.

2.2.3.5.1 Herstellung eines infektiösen Überstands

Am Vorabend der Transfektion wurden 1,5 bis 3×10^6 293T-Zellen pro Zellkulturplatte (6 cm Durchmesser) angeimpft. Am Tag der Infektion wurde das Medium durch 4 ml Transfektionsmedium (Pyruvatmedium) ersetzt.

Transfektionsmix:

10 μg pLEN (mit Zielgen),

5 μg pHIT 60,

5 μg pHIT 123,

65 μ l 2M CaCl₂,
H₂O ad 500 μ l

500 μ l 2 x HeBS wurde dem Transfektionsmix unter sofortigem Vortexen zugegeben und diese Mischung sofort auf die Zellkulturplatte aufgetropft. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium durch RPMI⁺/10 % FCS ersetzt und wiederum einen Tag später wurde der virale Überstand zum ersten Mal geerntet. Dafür wurde er abgenommen und durch einen 0,4 μ m Filter sterilfiltriert. Dieser ÜS wurde entweder sofort zur Infektion verwendet oder bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden wieder mit Medium versorgt und am nächsten Tag wurde erneut Überstand abgenommen.

2.2.3.5.2 Infektion der Zielzellen

Am Vortag der Infektion wurden 5 x 10⁴ konfluente Zielzellen pro Ansatz (z.B. THOs, P815-rCD80- und RMA-S-Zellen) in 0,5 ml RPMI⁺ angeimpft. Am Tag der Infektion wurden die Zielzellen zentrifugiert und in 250 μ l RPMI⁺ pro Ansatz resuspendiert. Zusammen mit 20 μ l Polybren und 250 μ l infektiösem Überstand wurden sie in eine 24-Napf-Platte geben und der Ansatz gemischt. Dieser wurde zunächst für eine halbe Stunde in den Inkubator gestellt, dann 20 mM HEPES zugegeben und die Platte für 99 Minuten bei 2.300 rpm in der Zellzentrifuge bei RT zentrifugiert. Die Platte wurde danach für eine halbe Stunde in den Inkubator gestellt, anschließend die Zellen gewaschen und in 1 ml Medium aufgenommen. Am nächsten Tag wurde die Infektion wiederholt. Die Expression des Zielgens ist nach 24 Stunden meßbar. Positive Zellen wurden dann kloniert oder sortiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Die präferentielle Interaktion von $V\alpha 8.2^+$ -CD8-T-Zellen mit dem MHC-Komplex der LEW.1F-Ratte.

MHC-Moleküle interagieren mit T-Zellen. In der thymischen Selektion führt die TCR/MHC-Interaktion zur Herausbildung des Repertoires reifer T-Zellen. In der Peripherie ist die MHC-Interaktion notwendig, damit die T-Zellen antigene Peptide erkennen und darauf reagieren können. Bei der künstlich herbeigeführten TCR/allo¹-MHC-Interaktion in einer Transplantation oder MLR wird ebenfalls eine TC-Aktivierung eingeleitet, allerdings nicht induziert durch ein fremdes Peptid, sondern durch einen anderen (allo) MHC.

In unserer Arbeitsgruppe war eine präferentielle Interaktion eines TCR-V-Segments mit dem MHC der LEW.1F-Ratte (RT1^f) beobachtet worden: RT1^f stimuliert bevorzugt – und in diesem Ausmaß wurde derartiges nirgends sonst beschrieben – die Expansion TCR-V $\alpha 8.2$ -Segment-positiver im Vergleich zu der AV8S2-negativer CD8-T-Zellen. Dieses Phänomen konnte sowohl in der thymischen Selektion als auch bei der Alloerkennung in einer MLR beobachtet werden: circa 13 % der reifen CD8-T-Zellen der LEW.1F-Ratte sind AV8S2-positiv, aber nur 1-2 % der CD8-Zellen bei thymischer Selektion durch andere MHC-Haplotypen. In einer MLR expandieren AV8S2-positive CD8-T-Zellen bei RT1^f-Allostimulation ungefähr dreimal so stark wie bei Stimulierung mit anderen Haplotypen (TORRES-NAGEL et al. 1994).

Auslöser dieses Phänomens ist vermutlich ein polymorphes MHC Kl. I-Protein der LEW.1F-Ratte, da die präferentielle Expansion von AV8S2-Zellen nur im

¹Allo bedeutet anders. In der Immunologie werden mit dieser Vorsilbe genetisch nicht identische Mitglieder einer Art belegt.

CD8-T-Zell-Kompartiment auftritt und CD8-T-Zellen mit MHC Kl. I-Proteinen interagieren.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte, das diese präferentielle Expansion verursacht, zu identifizieren und zu charakterisieren. Zusätzlich sollten die Kontaktpunkte der Interaktion zwischen dem TCR-AV8S2-Segment und dem MHC-Molekül kartiert werden. Zunächst aber sollte die Basis dieser Arbeit reproduziert werden: die beobachtete präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen durch den MHC der LEW.1F-Ratte.

Zuerst wurde die AV8S2-Expression reifer T-Zellen betrachtet. Dafür wurde mittels einer durchflußzytometrischen Analyse (FACS) der TCR-V α -Segmentgebrauch verschiedener Rattenstämme untersucht. Es konnte bestätigt werden, daß V α 8.2-exprimierende CD8-T-Zellen in der LEW.1F-Ratte (RT1^f) überselektiert sind: mehr als 11 % der CD8-T-Zellen verwenden dieses Segment. In der LEW-Ratte dagegen (RT1^l) findet keine Überselektion statt: 2 % der CD8-Zellen sind AV8S2⁺. In der DA-Ratte (RT1^a), die hier als Negativkontrolle dient, da ihr das TCR-V α 8.2-Segment fehlt, sind V α 8.2⁺-CD8-Zellen nicht detektierbar (Abb. 3.1). Zusammengefaßt dargestellt sind diese Daten in Abb. 3.2.

Auch die für die präferentielle AV8S2-Zell-Expansion in der RT1^f-Alloerkennung bekannten Ergebnisse wurden bestätigt: Dafür wurden LEW-Responderzellen mit bestrahlten LEW.1F- und zum Vergleich mit DA-Stimulatorzellen² in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) stimuliert. Der Prozentsatz an V α 8.2-positiven CD8-T-Zellen in der Responderpopulation wurde ermittelt. Dabei wurden Blasten (große Zellen) – das sind die Zellen, die den fremden MHC erkannt haben und darauf mit blastoider Vergrößerung und Proliferation reagieren – mit den kleinen, nicht reaktiven Zellen verglichen.

Es konnte bestätigt werden, daß V α 8.2-exprimierende CD8-T-Zellen in einer Alloerkennung des MHC der LEW.1F-Ratte präferentiell expandieren, nicht aber bei RT1^a-Alloerkennung (Abb. 3.3). Im ersten Fall unterscheidet sich der Prozentsatz der V α 8.2-exprimierenden unreaktiven (kleinen) und reaktiven Zellen (Blasten) sehr stark, im zweiten Fall bleibt er gleich (Abb. 3.4).

Somit konnten die Daten, die als Grundlage für diese Arbeit dienen, reproduziert werden.

²Wie sich im Lauf dieser Arbeit herausstellte (Abschn. 3.2.2), ist das MHC Kl. I-Molekül des a-Haplotyps dem der LEW.1F-Ratte sehr ähnlich. a-Haplotyp-Stimulatoren sind aufgrund dieser großen Ähnlichkeit der bestmögliche Vergleich.

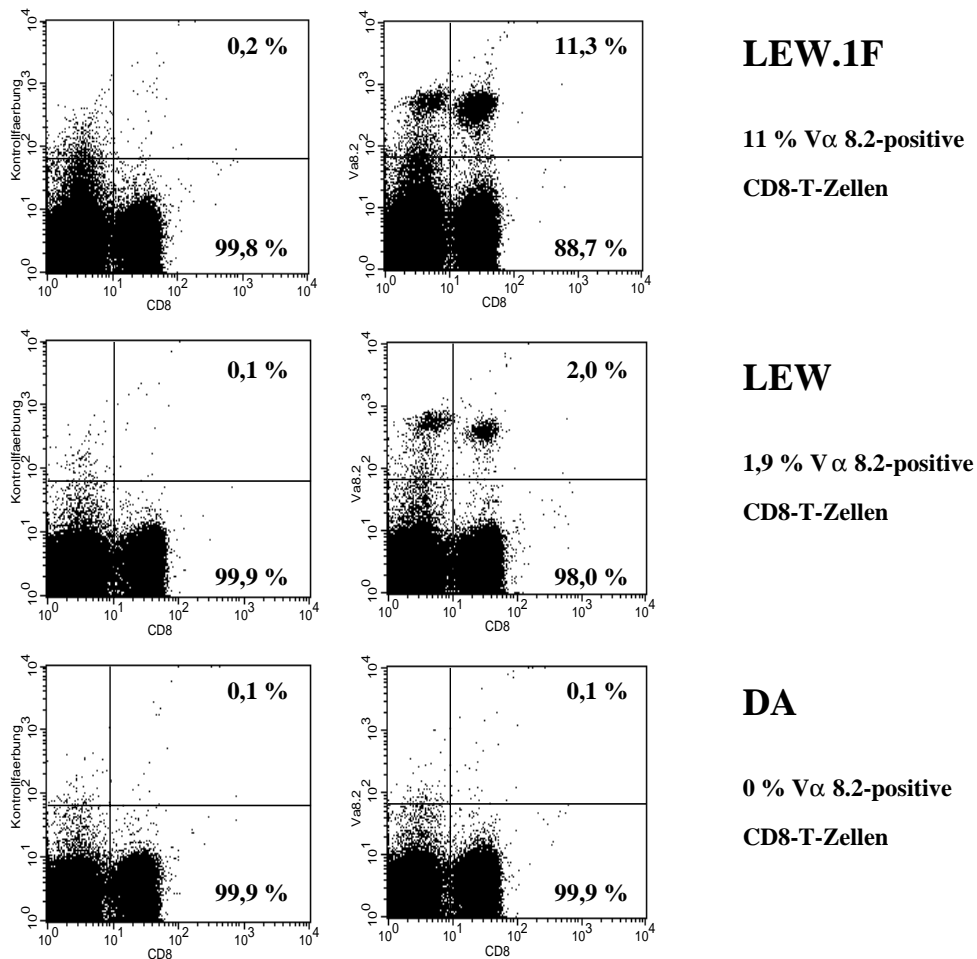


Abbildung 3.1: Der Prozentsatz V α 8.2-positiver CD8-Zellen in der LEW.1F-, der LEW- und der DA-Ratte.

Gefärbt wurden NW-gereinigte LN-Zellen. Die **linken** Kästchen zeigen eine Färbung mit dem **Isotypkontrollantikörper** (nach oben aufgetragen) und anti-CD8 β (nach rechts). Die **rechten** Kästchen zeigen eine Färbung mit anti-V α 8.2 (nach oben aufgetragen) und wiederum anti-CD8 β . Für die CD8-T-Zellen ist der Prozentsatz an V α 8.2-positiven- und V α 8.2-negativen-Zellen in den Kästchen angegeben. Rechts neben den Kästchen ist er nach Bereinigung (Abzug der Negativkontrolle) angegeben. Da die einzelnen Prozentangaben auf den exakten Zellzahlen beruhen, können sich im Vergleich untereinander Rundungsabweichungen ergeben.

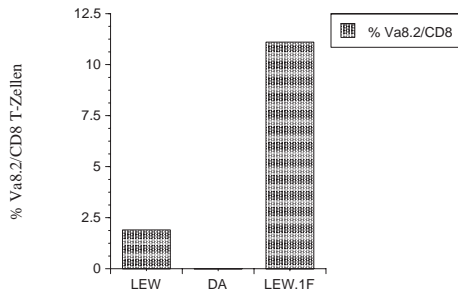


Abbildung 3.2: Überselektion von $V\alpha 8.2^+$ -CD8-T-Zellen in der LEW.1F-Ratte. Die Höhe der Balken zeigt jeweils den Prozentsatz $V\alpha 8.2$ -exprimierender CD8-T-Zellen aus den gesamten CD8-T-Zellen in den drei verschiedenen Haplotypen.

3.2 Klonierung eines polymorphen MHC Kl. I-Moleküls der LEW.1F-Ratte.

3.2.1 Strategie der Klonierung eines polymorphen MHC Kl. I-Moleküls.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das polymorphe MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte, das für die Überselektion von $V\alpha 8.2$ -CD8-T-Zellen in der positiven Selektion und in der Alloreaktion verantwortlich ist, zu klonieren.

Ein Problem bei der Klonierung von MHC-Genen ist ihr starker Polymorphismus: Die Sequenzen variieren nicht nur zwischen den Arten, sondern sogar unter den Haplotypen einer Spezies beträchtlich. Daher ist die Auswahl geeigneter Oligonukleotide kritisch und kann letztlich nur durch Ausprobieren ermittelt werden. Eine weitere Schwierigkeit stellt die große Vielzahl nicht klassischer Kl. I-Gene (Ib) im MHC-Locus dar, die sich in der Sequenz von den klassischen Genen (Ia) nicht alle deutlich unterscheiden (YEAGER und HUGHES 1999; HUGHES et al. 1999). Ein über RT-PCR isoliertes Gen kann also nicht alleine anhand seiner Sequenz als Ia-Gen eingestuft werden. Die Übereinstimmung der Alloantikörper-Erkennung³ des Spenders mit der des klonierten Moleküls und die Erkennung in einem Zytotoxizitätstest durch Spender-(RT1^f-)reaktive T-Zellen gemeinsam mit der Sequenz sind dagegen hinreichende Kriterien zur Klassifizierung eines so isolierten Moleküls als Ia-Gen. Die Erfüllung dieser Anforderungen muß nach der anfänglichen Isolierung von Kandidaten-Genen überprüft werden.

Demzufolge wurde die Strategie verfolgt, durch RT-PCR erhaltene Klone transient in cos-Zellen zu transfizieren und durch FACS-Analyse mit zunächst ei-

³Alloantikörper sind Antikörper eines (Ratten-) Stammes gegen einen anderen. Sie erkennen typischerweise polymorphe MHC-I-Moleküle. Isolierte MHC-Ia-Gene einer Ratte müssen deren Alloantikörperreaktivität abdecken.

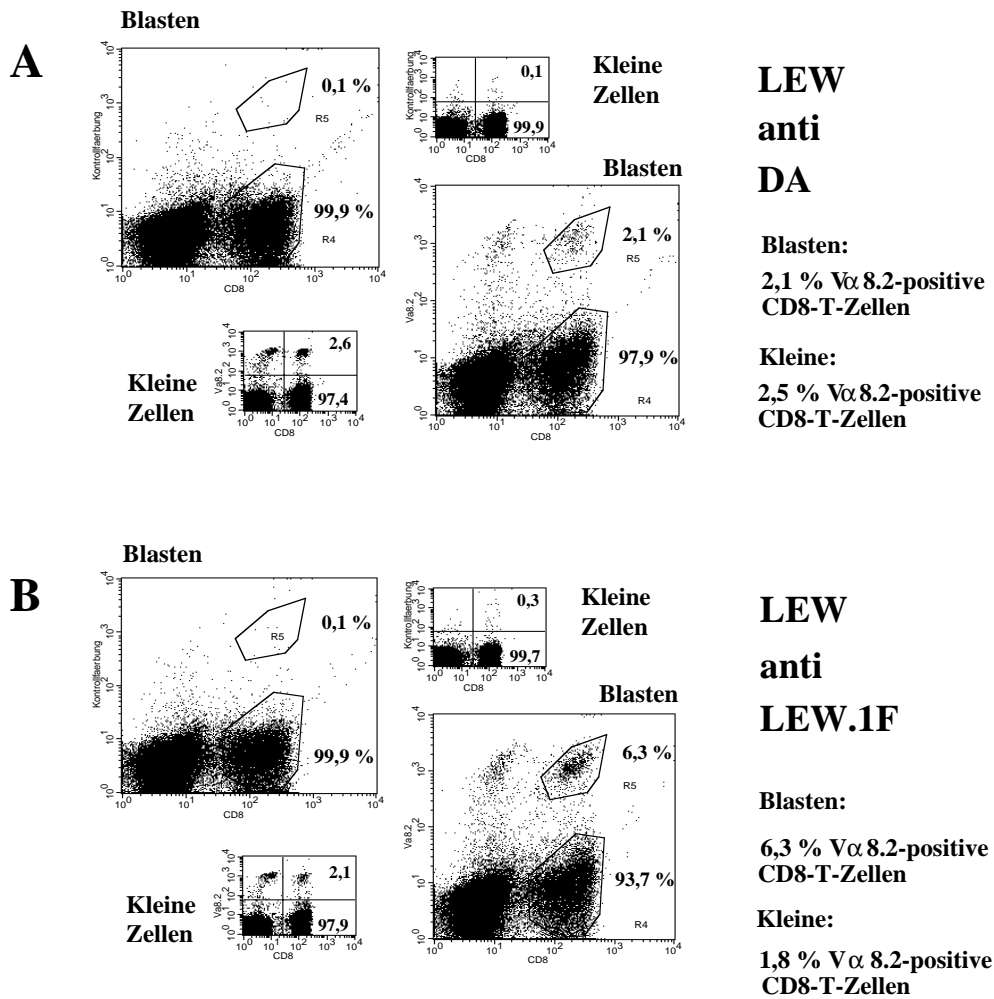


Abbildung 3.3: Der Prozentsatz V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen in der Alloerkenntnis des DA- (A) bzw. des LEW.1F-MHC (B).

MLR von LEW NW-gereinigten LN-Zellen gegen bestrahlte DA- bzw. LEW.1F-LN-Zellen. Jeweils die beiden **oberen** Kästchen zeigen eine Färbung mit dem **Isotypkontrollantikörper** (L180/1, nach oben aufgetragen) und anti-CD8 β (nach rechts); dabei steht das kleine Kästchen für die kleinen Zellen, das große für die Blasten. Die jeweils **unteren** Kästchen zeigen die Färbung gegen V α 8.2 (nach oben) und CD8 β .

In den Kästchen ist der Prozentsatz der V α 8.2-positiven (bzw. L180/1-„positiven“) CD8-T-Zellen ausgerechnet. Für die kleinen Zellen wurde zur Kalkulation der Quadrant verwendet, für die Blasten die eingezeichneten Regionen R4 und R5. Rechts neben den Kästchen ist der Prozentsatz AV8S2-positiver CD8-T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle angegeben. Da die einzelnen Prozentangaben auf den exakten Zellzahlen beruhen, können sich im Vergleich untereinander Rundungsabweichungen ergeben.

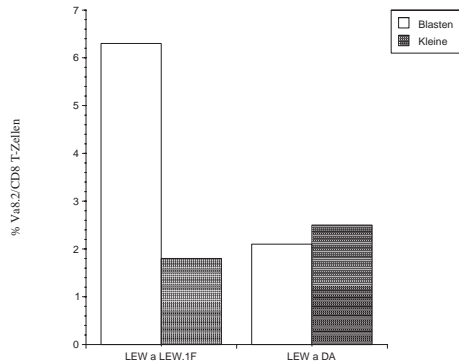


Abbildung 3.4: Präferentielle Expansion $V\alpha 8.2$ -positiver CD8-T-Zellen bei der Alloerkennung von $RT1^f$. MLR von LEW-LN-Zellen gegen bestrahlte DA- oder LEW.1F-Stimulatorzellen.

Die Balken geben den Prozentsatz an $V\alpha 8.2^+$ -CD8-T-Zellen an. Die dunkel schattierten Balken indizieren die kleinen Zellen, die nicht auf den Allo-MHC reagiert haben. Die hellen Balken stehen für die blastoid vergrößerten Zellen, die als Antwort auf den Allo-MHC zu proliferieren begonnen haben.

ner Mischung an f-reaktiven Alloantikörpern zu überprüfen. Es wurde nämlich vermutet, daß in der Ratte zwei exprimierte klassische Kl. I-Gene vorhanden sein könnten, die die Alloantikörperreaktivität unterschiedlich unter sich aufteilen könnten (JOLY et al. 1996). Um daher das relevante Gen mit nur wenigen Antikörpern nicht zu übersehen, sollten die cos-Transfektanten mit einer Mischung an Antikörpern „gescreent“ werden und so entdeckte Klone durch einen größeren Ansatz mit den einzelnen Antikörpern überprüft werden. In diesem Test ebenfalls positive Kandidatengene sollten weiter analysiert werden: zuerst sequenziert werden und nach ihrer stabilen Expression in L-Zellen mit allen vorhandenen Alloantikörpern und durch den vorher beschriebenen Zytotoxizitätstest charakterisiert werden (s. auch Abschn. 3.2.2, S. 66 3.3.1, S. 70 und 3.3.2, S. 72). Nach einer derartigen Charakterisierung wäre die Ia-Natur klonierter Gene sichergestellt.

Für die RT-PCR wurde – nach konventioneller cDNA-Isolierung aus conA-stimulierten Milzzellen – zunächst ein Oligonukleotidpaar ausgewählt, das durch den Vergleich zwischen einer bekannten Ratte-cDNA-Sequenz und Maus-Sequenzen entwickelt worden war, um präferentiell cDNAs aus dem klassischen Kl. I-Locus der Ratte ($RT1.A$) zu amplifizieren (JOLY et al. 1995). Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation einer Region in der cDNA-Sequenz, die für das gesamte reife Kl. I-Protein codiert; der Leader fehlt. Der Vorwärtsprimer (EJus) bindet am Ende der Leadersequenz kurz vor Beginn der $\alpha 1$ -Domäne des MHC Kl. I-Moleküls, überlappend mit einer natürlichen *NotI*-Restriktionsschnittstelle. Der Rückwärtsprimer (EJds) bindet am Stopcodon und führt eine *XbaI*-Restriktions-

schnittstelle ein (Abb. 3.5, B).

Mit diesem Paar war eine Amplifikation einer polymorphen MHC Kl. I-Sequenz der LEW.1F-Ratte nicht möglich. Wie später festgestellt werden konnte, war das durch eine abweichende Nukleotidabfolge im Bereich der *NotI*/E_Jus-Erkennungssequenz bedingt (Abb. 3.5, A). Aus der LEW-Ratte aber konnte mit dieser Primerkombination ein bereits bekanntes, polymorphes MHC Kl. I-Gen kloniert werden, der Klon 1/24.⁴

Kurz darauf wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine neue Oligonukleotidkombination beschrieben, die auch die 3'-nicht-translatierte-Region amplifiziert (WANG et al. 1996). Mit dem Oligo-d(T)-Primer (W001c) wurde die cDNA-Synthese durchgeführt. Er enthält den oligo-d(T)-Bereich gefolgt von einem zusätzlichen Sequenzabschnitt, der eine *XbaI*-Schnittstelle einführt.

Der Vorwärtsprimer (W002us) wurde aus der Consensussequenz von acht Ratte-Kl. I-Sequenzen erstellt und bindet am Beginn der Leadersequenz. Er vermittelt die Spezifität dieser PCR. Der Rückwärtsprimer dagegen bindet unspezifisch an alle cDNAs, da er 5' die Zusatzsequenz (und damit auch die *XbaI*-Schnittstelle) des Oligo-d(T)-Primers enthält.

Für diese Arbeit wurde W002us zu W004us modifiziert, so daß er eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle einführt, damit das PCR-Produkt in den angestrebten Vektor pCMUIV kloniert werden konnte.

Mit dieser Primerkombination konnte ein PCR-Produkt erzielt werden. Es wurden mehrere unabhängige PCRs durchgeführt, wobei für jede dieser PCRs einige Parallelansätze vereinigt wurden. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XbaI* geschnitten, die am Beginn und Ende des PCR-Produkts an den durch die Oligonukleotide eingeführten Restriktionsschnittstellen schneiden (Abb. 3.5, C).

Das geschnittene PCR-Produkt wurde in den Vektor pCMUIV (JOLY und OLDSTONE 1991b; JOLY und OLDSTONE 1991a) ligiert, der einen SV40-Enhancer und einen α Globulin-1-Promotor enthält und eine Ratte-Kl. I-Leadersequenz mitbringt. Da in dem W002us/W003ds-PCR-Produkt ohnehin schon ein Leader vorhanden ist, enthält pCMUIV-A^f nun zwei⁵ (Abb. 3.5, C). Mit diesem Ligationsprodukt wurde *E.coli DH5 α* transformiert.

Aus siebzig der so erhaltenen Kolonien wurde DNA isoliert und diese nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *BamHI* bzw. *PvuII* auf einem Agarosegel analysiert. *BamHI* schneidet im Vektor am Anfang der Leadersequenz und 5' nach dem Insert, *PvuII* schneidet 3' vor dem Vektor-Leader und im Insert an einer natürlich vorhandenen Restriktionsschnittstelle (Abb. 3.5, C).

Aufgrund des Restriktionsmusters und der Länge der erhaltenen Produkte wur-

⁴1/24 stimmt mit der bekannten LEW-1-Haplotyp-Sequenz überein.

⁵Die Expression wurde dadurch aber nicht nachteilig beeinflusst.

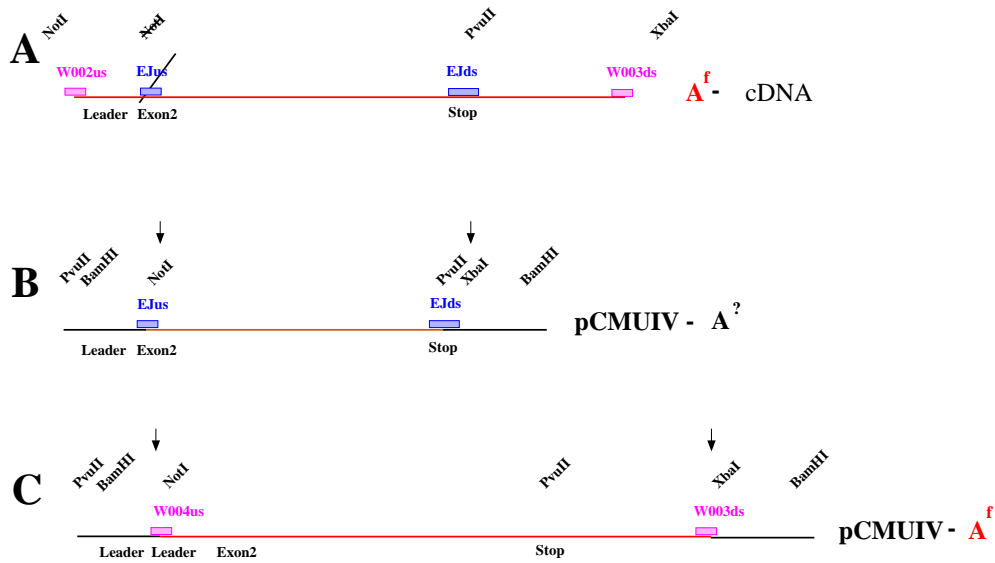


Abbildung 3.5: Klonierung der PCR-amplifizierten cDNA in den Vektor pCMUIV. Im obersten Teil der Abbildung (A) ist die A^f-cDNA zu sehen und die hypothetischen Primerbindungsstellen. Im mittleren Bereich (B) ist der Vektor pCMUIV dargestellt, mit hineinkloniertem EJus/EJds-PCR-Produkt, im untersten Teil (C) ist der Vektor pCMUIV gezeigt, mit hineinkloniertem – durch W004us/W003ds amplifiziertem – LEW.1F-PCR-Produkt.

den die so analysierten Plasmide vorläufig in verschiedene Gruppen aufgeteilt, und es wurde mindestens ein Mitglied jeder Gruppe, insgesamt dreiundzwanzig Klone, einzeln weiter analysiert. Dafür wurden cos-Zellen mit diesen Klonen transient transfiziert und mit einer Mischung RT1^f-reaktiver Alloantikörpern getestet (BUTCHER 1987).

Acht der getesteten cos-Transfektanten wurden durch die Mischung an f-reaktiven Alloantikörpern erkannt. Diese können mit Ausnahme von Klon 21, der kürzer war, alle in eine Gruppe eingeordnet werden. Die acht Kandidatenklone wurden auch anschließend in einer umfassenderen Analyse mit einzeln angewandten Antikörpern erkannt.

3.2.2 Sequenz des polymorphen MHC Kl. I-Gens der LEW.1F-Ratte, RT1.A^f.

Diese acht Kandidatenklone, die in der FACS-Analyse der cos-Transfektanten mit RT1^f-reaktiven Antikörpern erkannt wurden, wurden sequenziert. Darunter war auch der Klon 21, der im Restriktionsverdau kürzer als die anderen war.

Die Klone wurden vorwärts und rückwärts mit überlappenden Primern sequenziert. Die Konsensus-Nukleotidsequenz⁶ ist in Abb. 3.6 gezeigt und unter der Zugangsnummer Y14014 (Genbank) im Internet erhältlich. Abb. 3.7 zeigt die Aminosäuresequenz.

Das codierte Gen wurde RT1.A^f genannt: RT1 steht für den MHC der Ratte, A ist der Genlocus der klassischen Kl. I-Gene und f bezeichnet den Haplotyp.

Von einer kooperierenden Arbeitsgruppe in Babraham (Drs Etienne Joly und Geoff Butcher) konnte später die A^f-Sequenz bestätigt werden, und es wurde ein weiteres Kl. I-Gen aus der LEW.1F-Ratte kloniert, das A2^f genannt (Y13579; Abb. 3.8 und 3.9) und uns zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt wurde (JOLY et al. 1998).

A^f und A2^f unterscheiden sich voneinander in 27 Aminosäuren, sie sind also relativ entfernt verwandt. Das A^a-Molekül dagegen ist dem A^f-Molekül sehr ähnlich: diese beiden unterscheiden sich nur in sieben Aminosäuren. Außerdem fehlt A^f im zytoplasmatischen Exon 7 noch ein Glyzin. Die Verwandtschaft der verschiedenen Allele läßt sich gut in Abb. 3.10 erkennen. Diese Abbildung zeigt einen Vergleich der Nukleinsäuresequenzen (Exon 2 bis zum Stopcodon) von vierzehn klassischen Ratte-MHC Kl. I-Genen. Die horizontalen Distanzen sind dem Grad der Verwandtschaft umgekehrt proportional: je verwandter zwei Gene sind, desto kürzer ist der Abstand. Abb. 3.10 zeigt weiterhin, daß sich A^f und A2^f von den anderen klassischen Kl. I-Genen nicht stärker unterscheiden als diese sich untereinander.

⁶Es gibt ca. einen Nukleotidaustausch pro kb; Klon 21 fehlt das Exon 6.

```

1   GGCTCCACT CGCTGCGGTA TTTCTACACC GCCGTGTCCC GGCCCGGCCT
51  CGGGGAGCCC CGGTTTCATCG CTGTCCGGTA CGTGGACGAC ACCGAGTTCG
101 TGCCTTTCGA CAGCGACGCG GAGAATCCGA GGATGGAGCC GCGGGCGCGG
151 TGGATGGAGC GGGAGGGGCC GGAGTATTGG GAGGAGGAG CACAGATCGC
201 CAAGGGACAC GAGCAGATTT ACCGAGTGGA CCTGAGGACC CTGCGCGGCT
251 ACTACAACCA GAGCGAGGGC GGCTCTCACA CCATCCAGGA GATGTATGGC
301 TGTGACGTGG GGTCCGACGG GAGCCTCCTC CGCGGATATA GGCAGGACGC
351 CTACGATGGC CGCGATTACA TCGCCCTGAA CGAAGACCTG AAGACGTGGA
401 CGGCGGCGGA CTTTGCGGCA CAGATCACCC GGAACAAGTG GGAGCGGGCT
451 CGTTATGCAG AGAGACTCAG GGCCTACCTG GAGGGCACGT GCGTGGAGTC
501 GCTCCGCAGA TACCTGGAGC TCGGGAAGGA GACACTGCTG CGCTCAGATC
551 CCCAGAGGC ACATGTGACC CTTACCCCA GACCTGAAGG TGATGTCACC
601 CTGAGGTGCT GGGCCCTGGG CTTCTACCCCT GCTGACATCA CCCTGACCTG
651 GCAGTTGAAT GGGGAGGACC TGACCCAGGA CATGGAGCTT GTGGAGACCA
701 GGCCTGCAGG GGATGGAACC TTCCAGAAGT GGGCATCTGT GGTGGTGCCT
751 CTTGGGAAGG AGCAGAATTA CACATGCCGT GTGGAGCATG AGGGGCTGCC
801 TAAGCCACTT TCCCAGAGAT GGGAACCTTC TCCATCGACT GACCCCAACA
851 TGGAAACCAC TGTCATTTAT GTCATCCTTG GAGCTGTGGC CATGATTGGA
901 GCTGTGGCCA TCATAGGAGC TATGGTGGCT GTTGTGAGGA GGAGGAAGAG
951 AAACACAGGT GGAAAAGGAG AATACGCCCC TGCTCCAGGC AGGGACAGCT
1001 CCCAGAGCTC CGATGTGTCT CTCCAGATT GTAAAGCATG A

```

Abbildung 3.6: Nukleotidsequenz von A^f von Exon 2 (α 1-Domäne) bis zum Stopcodon.

Die fettgedruckten Basen bezeichnen jeweils den Beginn eines neuen Exons (α 1, α 2, α 3, transmembran und zwei zytoplasmatische Exons). Die unterstrichenen Nukleotide zeigen die Codons, die für die sieben Aminosäuren Unterschiede zwischen A^a und A^f codieren. Genbank-Zugangsnummer: Y14014.

```

1   GSHSLRYFYT AVSRPGLGEP RFIAVGYVDD TEFVRFDSDA ENPRMEPRAR
51  WMEREGPEYW EEETQIAKGH EQIYRVDLRT LRGYYNQSEG GSHTIQEMYG
101 CDVGS DGSLL RGYRQDAYDG RDYIALNEDL KTWTAADFAA QITRNKWERE
151 RYAERLRLAYL EGTVCVSLRR YLELGKETLL RSDPPEAHVT LHPRPEGDVT
201 LRCWALGFYP ADITLTWQLN GEDLTQDMEL VETRPAGDGT FQKWASVVVP
251 LGKEQNYTCR VEHEGLPKPL SQRWEPSPST DPNMETTVIY VILGAVAMIG
301 AVAILIGAMVA VVRRRKRNTG GKGEYAPAPG RDSSQSSDVS LPDCKA*

```

Abbildung 3.7: Aminosäuresequenz von A^f von Exon 2 (α 1-Domäne) bis zum Stopcodon.

Die fettgedruckten Aminosäuren zeigen den Beginn eines neuen Exons an, die unterstrichen hervorgehobenen Aminosäuren sind diejenigen, die zwischen A^a und A^f unterscheiden.

```

1   GGCTCACACT CGCTGCGGTA TTTCTACACC GCCGTGTCCC GGCCCGGCCT
51  CGGGGAGCCC CGGTACATGG AAGTGGGCTA CGTGGACGAC ACGCAGTTCG
101 TGCCTACGA CAGCGACGCG GAGAATCCGA GATATGAGCC GCGGGCGCGG
151 TGGATGGAGC GGGAGGGGCC GGAGTATTGG GAGGAGGAGA CACAGAAAAGC
201 CAAGGAAGGC GAGCAGATTT ACCGAGTGGA CCTGAGGACC CTGCGCGGCT
251 ACTACAACCA GAGCGAGGGC GGCTCTCACA CCATCCAGGT GATGTATGGC
301 TGTGACGTGG GGTCCGACGG GAGCCTCCTC CGCGGATATA GGCAGGACGC
351 CTACGATGGC CGCGATTACA TCGCCCTGAA CGAAGACCTG AAGACGTGGA
401 CGGCGGCGGA CTTTGC GGCA CAGATCACCC GGAACAAGTG GGAGCAGACT
451 GGTATGCAG AGAGACTCAG GGCCTACCTG GAGGGCACGT GTGTGGAGTG
501 GCTCCGCAGA TACCTGGAGC TCGGGAAGGA GACCGTGCTG CGCTCAGATC
551 CCCAGAGGC ACATGTGACC CTTACCCCA GACCTGAAGG TGATGTCACC
601 CTGAGGTGCT GGGCCCTGGG CTTCTACCCT GCTGACATCA CCCTGACCTG
651 GCAGTTGAAT GGGGAGGACC TGACCCAGGA CATGGAGCTT GTGGAGACCA
701 GGCCTGCAGG GGATGGAACC TTCCAGAAGT GGGCATCTGT GGTGGTGCCT
751 CTTGGGAAGG AGCAGAAATTA CACATGCCGT GTGGAGCATG AGGGGCTGCC
801 TGAGCCACTT TCCAGAGAT GGAGCCTTC TCCATCGACC AACTCCAACA
851 TGGAAACCAC TGTCATTAT GTCGTCCTTG GAGCCATCAT TGGAACCTG
901 GCCATCATG GAATTGTGGT GGCTGTTGTG AGGAGGAGGA GGAGAAACAC
951 AGGTGGGAAA GGAGACTACA CCCCTGCTCC AGGCAGGGAC AGCTCCAGA
1001 GCTCTGATGT GTCTCTCCA GATTGTAAAG CATGA

```

Abbildung 3.8: Nukleotidsequenz von $A2^f$ von Exon 2 ($\alpha 1$ -Domäne) bis zum Stopcodon.

Die fettgedruckten Buchstaben zeigen den Beginn eines neuen Exons an. Genbank-Zugangsnummer: Y13579.

```

1   GSHSLRYFYT AVSRPGLGEP RYMEVGYVDD TQFVRYDSDA ENPRYEPRAR
51  WMEREGPEYW EETQKAKEG EQIYRVDLRT LRGYYNQSEG GSHTIQVMYG
101 CDVSDGSSL RGRYQDAYDG RDYIALNEDL KTWTAADFAA QITRNKWEQT
151 GYAERLRLAYL EGTCVEWLR RYLELGETLL RSDPPEAHVT LHPRPEGDVT
201 LRCWALGFYP ADITLTWQLN GEDLTQDMEL VETRPAGDGT FQKWASVVVP
251 LGKEQNYTCR VEHEGLPEPL SQRWEPSPST NSNMETTIVY VVLGAIIGTL
301 AIIGIVVAVV RRRRRNTGGK GDYTPAPGRD SSQSSDVSLP DCKA*

```

Abbildung 3.9: Aminosäuresequenz von $A2^f$ von Exon 2 ($\alpha 1$ -Domäne) bis zum Stopcodon.

Die fettgedruckten Buchstaben zeigen den Beginn eines neuen Exons an.

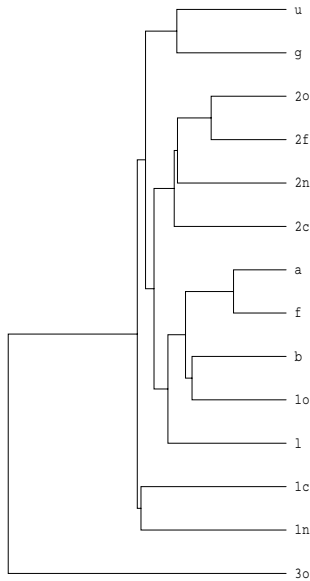


Abbildung 3.10: Sequenzhomologie der bekannten Ratte-MHC Kl. I-Sequenzen. Hier ist ein Vergleich der Nukleotid-Sequenzen von Exon2 bis zum Stopcodon zu sehen.

In dieser Art der Darstellung (pileup, gcg) sind die horizontalen Abstände proportional zu der Abweichung der Sequenzen voneinander.

3.2.3 Umklonierung der Ratte-MHC-Kl. I-Moleküle in einen retroviralen Vektor.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde eine Umklonierung des A^f -Moleküls und der anderen verwendeten Ratte-MHC Kl. I-Moleküle in einen retroviralen Vektor nötig: Die untersuchten MHC-Moleküle mußten für spätere Experimente (s. Abschn. 3.5.3, S. 84) in T-Zellhybridome eingebracht werden, die sich mit konventionellen Methoden nicht infizieren ließen. Aus diesem Grund wurden die Moleküle A^a , A^f und $A2^f$ mittels einer PCR-Klonierung in einen retroviralen Vektor eingebracht⁷: Dafür wurde mit dem Oligonukleotid Koszus, das zu Beginn des Translationsstarts bindet und eine *EcoRI*-Schnittstelle einführt und mit dem Oligonukleotid EJdsBamHI, das am Stopcodon bindet und eine *BamHI*-Schnittstelle einführt, eine PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten, geleluert und in den Vektor pLEN (Berberich) kloniert (Abb. 3.11).

Mit Hilfe dieses Konstrukts war es möglich, die T-Zellhybridome THO35/1 und THO53/4 und die Maus-Mastzellen P815-rCD80 (MAEDA et al. 1997), die

⁷ A^a wurde freundlicherweise von Dr. E. Joly zur Verfügung gestellt.

für die späteren Experimente (Kapitel 3.5.3) verwendet wurden, zu infizieren.

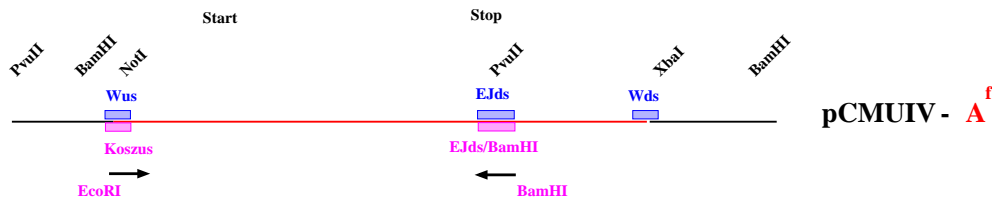


Abbildung 3.11: Umklonierung der Ratte-MHC Kl. I-Moleküle aus pCMUIV in pLEN, durch eine PCR mit den Oligonukleotiden Koszus und EJds/BamHI. Gezeigt ist die PCR an pCMUIV-A^f.

3.3 Charakterisierung des polymorphen MHC Kl. I-Moleküls der LEW.1F-Ratte A^f.

3.3.1 Typisierung des A^f-Moleküls durch Alloantikörper.

Beide MHC Kl. I-Moleküle der LEW.1F-Ratte und zum Vergleich das A^a-Molekül der LEW.1A-Ratte⁸ und das A^l-Molekül der LEW-Ratte⁹ wurden stabil in L-Zellen, in LEW-THOs (THO35/1) und in Maus-Mastzellen (P815-rCD80) exprimiert und mit allen uns verfügbaren Alloantikörpern gegen Ratte Kl. I-Moleküle (BUTCHER 1987) durchflußzytometrisch analysiert. Ratte-Alloantikörper entstehen durch die Immunisierung eines (präferentiell congenen¹⁰) Ratten-Haplotyps mit Zellen eines anderen. In der immunisierten Ratte entstehen daraufhin Alloantikörper gegen die MHC-I-Moleküle des anderen Haplotyps. Diese Alloantikörper reagieren häufig zusätzlich mit MHC-Molekülen wieder anderer Haplotypen.

Das A^f-Molekül wurde von allen getesteten LEW.1F-reaktiven Alloantikörpern erkannt¹¹. Dagegen erkannte es keiner der nicht mit LEW.1F-Zellen reagierenden Antikörper (Tab. 3.1). Das gibt einen starken Hinweis darauf, daß A^f ein klassisches MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte ist.

A2^f wurde interessanterweise dagegen nur von vier aus zehn spezifisch RT1^f-reaktiven Alloantikörpern erkannt (Tab. 3.1)¹².

⁸A^a unterscheidet sich von A^f nur in sieben Aminosäuren. A^a in pCMUIV wurde freundlicherweise von Dr. Joly zur Verfügung gestellt.

⁹A^l wurde nur in L-Zellen transfiziert, da sich A^a als die bessere Kontrolle herausstellte. A^l war ebenfalls in dieser Arbeit kloniert worden (Abschn. 3.2.1).

¹⁰Congene Rattestämme unterscheiden sich nur im MHC.

¹¹A^f wurde insgesamt mit 19 f-Haplotyp-reaktiven Antikörpern getestet (Daten nicht gezeigt).

¹²Der mAk JY1/232 wird hier zu den A2^f-reaktiven Antikörpern hinzugezählt, da für ihn eine

mAk	LEW.IF	DA	LEW	L-	L-f	L-a	L-2f	L-I	THO35/1	THO35/1-f	THO35/1-a	THO35/1-2f	P815-rCD80	P815-rCD80-f	P815-rCD80-a	P815-rCD80-2f
* F16.4.4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
* Ox18	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
# JY1/75	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
# JY1/232	+	+	+	-	+	+	(-)	+	+	+	+	+	-	+	+	(-)
# R2/15S	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
# GN3/2	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
# MAC-30	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
# JY1/132	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
# JY3/50	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	(-)
# YR1/146	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
# 5F3A	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
# YR2/69	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6/30/6	-	+	-	-	-	+	-	-	(+)	(+)	+	(+)	-	-	+	-
31/13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
I.1.69.1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
RIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L180/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.1: Färbung von Ratte-Lymphknotenzellen und von Zelllinien (L und P815-rCD80) und dem LEW-THO35/1, die eingebrachte Ratte-Kl. I-Gene exprimieren, mit Ratte Kl. I-spezifischen monoklonalen Alloantikörpern.

*: diese Antikörper erkennen Ratte-MHC-I-Moleküle unabhängig vom Haplotyp.

diese Antikörper sind f-Haplotyp spezifisch.

Auffallend in der Tabelle 3.1 sind die Alloantikörper 6/30/6 und YR2/69: 6/30/6 erkannte zwar kein Epitop auf der LEW-Ratte, wohl aber – wenn auch schwach – das LEW(RT1^l)-THO35/1; möglicherweise aufgrund einer Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit anderen Oberflächenmolekülen des THO35/1. YR2/69 reagierte mit keinem Epitop auf der DA-Ratte, wohl aber mit dem A^a-Molekül auf den Zelllinien. Die Bindung von YR2/69 an A^a ausschließlich in den Zelllinien, könnte dadurch erklärt werden, daß es dort in einer anderen Modifikation vorliegt, die die YR2/69-Reaktivität vermittelt.

A2^f-Erkennung nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3.2 Erkennung des A^f-Moleküls durch alloreaktive T-Zellen.

Die Sequenz und die Alloantikörperreaktivität geben starke Hinweise darauf, daß A^f ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül ist. Ein Beweis wäre die spezifische Erkennung des Moleküls durch RT1^f-alloreaktive zytotoxische T-Lymphozyten:

MHC-I-Proteine sind starke Alloantigene. Werden Zellen zweier Haplotypen z.B. in einer MLR oder MLC¹³ zusammengebracht, wobei die Zellen eines Haplotyps, die Stimulatorzellen, inaktiviert sind, so provozieren deren MHC-I-Moleküle die Differenzierung hochspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten (auch CTLs oder Effektoren genannt) des anderen Haplotyps.

Die zu überprüfenden Moleküle können auf ihre *in vivo*-Expression als MHC-Ia-Moleküle überprüft werden, indem sie in sogenannten Zielzellen exprimiert werden und deren Lyse durch die CTLs festgestellt wird. Sie erkennen das Molekül, das ihre Differenzierung initiierte in den „Zielzellen“ wieder und lysieren sie sehr gut.

Für diesen Zytotoxizitätstest wurden LEW-Zellen in einer MLC mit inaktivierten LEW.1F-Zellen stimuliert. Die entstandenen RT1^f-alloreaktiven Effektoren wurden an Ratte-MHC-I transfizierten Zielzellen ausgelesen und der Prozentsatz der spezifischen Lyse kalkuliert. Er macht eine Aussage über die Güte der Erkennung: ein in der LEW.1F-Ratte stark exprimiertes MHC-I-Molekül stimuliert eine heftige Alloreaktion und damit die Entstehung vieler hochspezifischer CTLs. Zielzellen, die MHC-I-Proteine exprimieren, die die CTL-Differenzierung provozieren, stimulieren folglich schon bei einem geringeren Effektor-/Zielzellverhältnis (Abszisse) die gleiche prozentuale Lyse (Ordinate) wie Zielzellen, die MHC-Proteine exprimieren, die in den Stimulatorzellen nicht oder nur schwach exprimiert wurden oder die nur schwach allogene (also keine typischen Ia-Moleküle) sind.

Zunächst wurden Ratte MHC-I-transfizierte L-Zellen als Zielzellen verwendet. Eine gleichstarke Expression der hineintransfizierten Ratte MHC-I-Gene läßt sich in Abb. 3.12 erkennen.

Wie in Abb. 3.13 zu sehen ist, wurden in diesem Zytotoxizitätstest A^f-transfizierte L-Zellen (L-f) besser erkannt als untransfizierte oder mit Kl. I-Molekülen von anderen Ratte-Haplotypen transfizierte L-Zellen. Dieser Versuch gibt also einen Hinweis darauf, daß A^f tatsächlich ein funktionelles, stark alloantigenes MHC-Ia-Molekül der LEW.1F-Ratte ist.

In diesem Versuch allerdings ist der Unterschied der Lyse der verschiedenen Wirtszellen nicht sehr prägnant. Das könnte daran liegen, daß sie zusätzlich zu

¹³Eine MLC (Kultur gemischter Lymphozyten, engl.: mixed lymphocyte culture) ist eine MLR (gemischte Lymphozytenreaktion, engl.: mixed lymphocyte reaction), die einem Zytotoxizitätstest vorangeht.

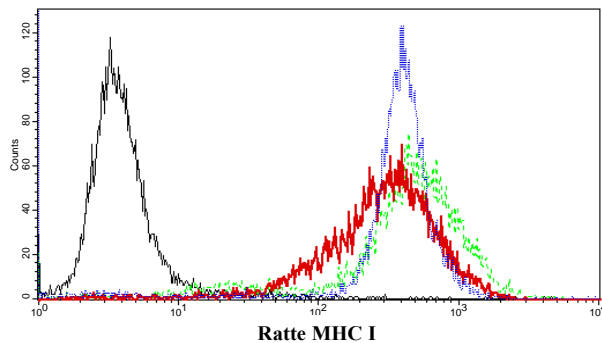


Abbildung 3.12: Ratte-MHC Kl. I-Expression der transfizierten L-Zellen. A^f-transfizierte L-Zellen sind als dicke rote Linie gezeigt, A^a-transfizierte als gestrichelte grüne Linie, A2^f-transfizierte als gepunktete blaue Linie und untransfizierte L-Zellen als dünne schwarze Linie.

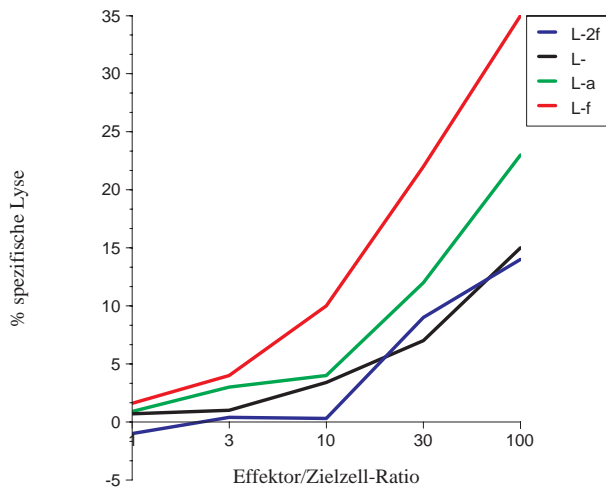


Abbildung 3.13: Erkennung der Kl. I-transfizierten L-Zellen durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.

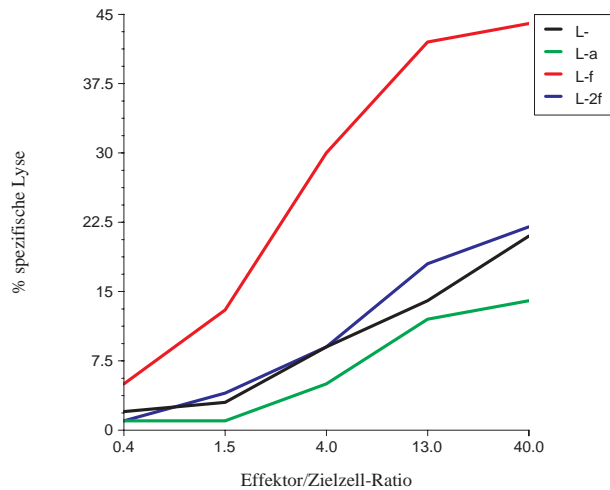


Abbildung 3.14: Erkennung der Kl. I-transfizierten L-Zellen durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest. Restimulation und Blockade der Maus-MHC Kl. I-Moleküle.

den eingebrachten Ratte-MHC-Genen noch eigene, also Maus-MHC-Moleküle exprimieren, mit denen die RT1^f-reaktiven CTLs kreuzreagieren könnten. Um diese mögliche Hintergrundlyse zu unterdrücken, wurde im nächsten Versuch mit monoklonalen Antikörpern gegen Kl. I-MHC der L-Zellen (H-2^k) geblockt. Nach dem Maskieren des Maus-MHC unterschied sich die Lyse der verschiedenen L-Zellpopulationen tatsächlich viel stärker:

Abb. 3.14 zeigt, daß A^f-transfizierte L-Zellen von f-Haplotyp-reaktiven Effektoren stark, untransfizierte und A^a-transfizierte L-Zellen dagegen nur wenig lysiert wurden. Das bedeutet, daß A^f ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte ist. Außerdem zeigt es die hohe Spezifität eines derartigen Zytotoxizitätstests, da sich A^a von A^f extrazellulär nur in sieben Aminosäuren unterscheidet. A2^f-transfizierte L-Zellen wurden in diesem Test wider Erwarten nicht erkannt.

Um diese Daten weiter zu unterstützen, wurde als weitere „Trägerlinie“ ein T-Zellhybridom (THO) verwendet. Das THO35/1 wurde aus einer Fusion von LEW-Rattenzellen mit Maus-Zellen gewonnen. Es exprimiert also schon von sich aus zwei MHCs (Maus und Ratte), die bei den späteren Versuchen – analog zu den L-Zell-Ergebnissen aufgrund unspezifischer Hintergrundlyse bereits der uninfizierten THOs – stören müßten.

Das Gegenteil ist aber der Fall: Die xenogenen Maus-MHC Kl. I-Moleküle sind nur sehr schwach exprimiert, so daß sie nur wenig unspezifische Aktivierung der LEW-Effektoren nach sich ziehen (Abb. 3.15).

Der allogene Ratte-MHC stört ebenfalls nicht, da er mit dem Effektor-MHC

übereinstimmt und so für die LEW-Effektoren neutral ist. Damit stimuliert das THO35/1 bei LEW-Effektoren eine nur sehr schwache Hintergrundlyse.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung dieses Hybridoms anstelle der L-Zellen war, daß als „Positivkontrolle“ ein von der LEW.1F-Ratte stammendes T-Zellhybridom, das THO64, verwendet werden konnte.

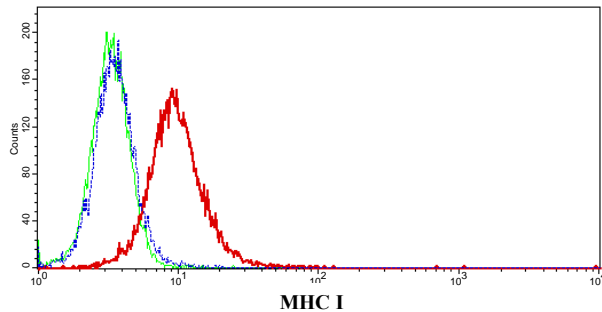


Abbildung 3.15: Expression von endogenen Maus- und Ratte-MHC Kl. I-Molekülen des THO35/1.

Die grüne gestrichelte Linie zeigt die Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper. Die blaue gestrichelte Linie ist eine Färbung des Maus-MHC Kl. I-Moleküls K^k, die rote dicke Linie ist eine Färbung von Ratte-Kl. I. Alle Antikörper sind unkonjugiert, der farbstoffgekoppelte Sekundärantikörper ist damPE.

Mit Hilfe dieses Hybridoms konnte gezeigt werden, daß A^f-infizierte Zellen (THO35/1-f) von RT1^f-reaktiven LEW-Effektoren genauso gut erkannt wurden wie das LEW.1F-THO64 selbst. A^f vereinigt also die gesamte RT1^f-Reaktivität auf sich. Das nicht infizierte LEW-THO und das A^a-infizierte LEW-THO wurden nicht erkannt (Abb. 3.16). Damit konnten die mit L-Zellen gewonnenen Daten bestätigt und somit gezeigt werden, daß A^f ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte ist.

Zur Bestätigung der A2^f-Daten wurde eine dritte Zelllinie herangezogen, die Maus-Mastzellen P815-rCD80 (MAEDA et al. 1997), deren Verwendung für spätere Versuche (s. Abschn. 3.5.3, S. 84 ff) notwendig geworden war. Die Expression der eingebrachten Ratte-Kl. I-Gene ist der Abb. 3.23 (S. 90) zu entnehmen.

In dem Zytotoxizitätstest Abb. 3.17 mit f-reaktiven Effektoren konnte gezeigt werden, daß A^f-exprimierende Maus-Mastzellen gut erkannt wurden, A^a- oder A2^f-exprimierende Maus-Mastzellen hingegen nicht. Damit können die L-Zelldaten auch für das A2^f-Molekül bestätigt werden.

Diese durch verschiedene Zelllinien und Hybridome gewonnenen Daten belegen zusammen mit der Gensequenz und der Alloantikörperreaktivität, daß A^f ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte ist, wohingegen das für A2^f nicht gezeigt werden konnte.

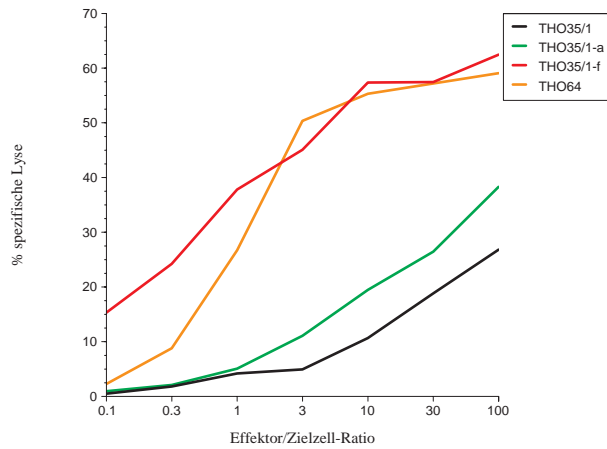


Abbildung 3.16: Erkennung der Kl. I-transfizierten T-Zellhybridome durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest (Restimulation). THO64 ist ein LEW.1F-T-Zellhybridom und wurde hier als Positivkontrolle verwendet; THO35/1 ist ein LEW-THO; alleine (ohne hineingebraachte weitere Ratte-Kl. I-Moleküle) ist es eine Negativkontrolle.

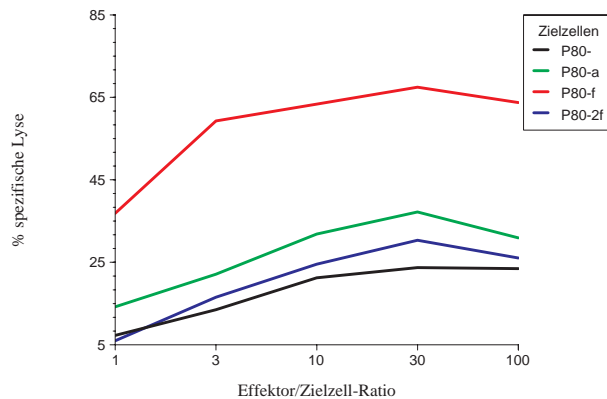


Abbildung 3.17: Erkennung der Kl. I-transfizierten P815-rCD80 Maus-Mastzellen (abgekürzt P80) durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.

3.3.3 Peptidbindung des A^f-Moleküls.

Eine wichtige Eigenschaft der MHC Kl. I-Moleküle ist – wie in Kap. 1.2.2, S. 14 ff erklärt – ihr Peptidbindungsmotiv. Daher sollte das A^f-Molekül bezüglich seiner Peptidbindungstaschen charakterisiert werden.

Dafür war die große Ähnlichkeit des A^f-Moleküls mit dem gut charakterisierten A^a-Molekül sehr hilfreich: Diese beiden MHC-Moleküle unterscheiden sich extrazellulär nur in sieben Aminosäuren.

Die Ankeramino­säuren für MHC-bindende Peptide werden hauptsächlich durch die F- (P9 des Peptids) und die B-Tasche (P2) der MHC-Moleküle definiert. Das Peptidbindungsmotiv des A^a-Moleküls ist gut bekannt; u.a. durch Poolsequenzierung eluierter Peptide und durch FACS-Analyse transfizierter RMA-S-Zellen (THORPE et al. 1995; POWIS et al. 1996; STEVENS et al. 1998). Da die F-Tasche in beiden Molekülen völlig übereinstimmt, hat sie voraussichtlich auch die gleiche Peptidbindungsanforderung (ein Arginin).

Die B-Tasche weicht in A^f allerdings von derjenigen des A^a-Moleküls in zwei Aminosäuren ab: AS 63 ist Bestandteil der A- und der B-Tasche, AS 70 gehört zur B- und zur C-Tasche (Tab. 3.5, Abb. 3.26) (FREMONT et al. 1992; MATSUMURA et al. 1992). Beide Aminosäuren sind also für die B-Tasche relevant, so daß sich der P2-Anker der A^f-bindenden Peptide vermutlich leicht vom P2-Anker der A^a-bindenden Peptide unterscheidet (Leu, Gln, Met). Eine Vermutung von Dr. James Stevens (Babraham) darüber, welche Ankeramino­säuren von der A^f-B-Tasche verlangt werden, nämlich hydrophobe AS wie Ala, Leu, Val, Phe oder Tyr, ermöglichte es, ein hypothetisches A^f-Motiv sehr gezielt zu testen.

So konnte ein Peptid (AASVSEEFR) aus der Aminosäuresequenz des Ovalbuminproteins ausgewählt werden, das das hypothetische Motiv enthält. Dieses Peptid wurde am Lehrstuhl für Physiologische Chemie in Würzburg bei Prof. Dr. Palm synthetisiert.

Für den Stabilisierungstest mußte das zu untersuchende Kl. I-Molekül zunächst in RMA-S-Zellen exprimiert werden: RMA-S-Zellen weisen einen defekten Peptidtransporter (TAP) auf, so daß sie nur leere MHC Kl. I-Moleküle exprimieren. Leere Moleküle sind jedoch instabil und zerfallen bei 37 °C. Wird nun ein definiertes Peptid von außen zugegeben, kann mittels FACS-Analyse geklärt werden, ob das verwendete Peptid das MHC-Molekül zu stabilisieren vermag, also das verlangte Motiv enthält (TOWNSEND et al. 1989; POWIS et al. 1991).

Dafür wurde das A^f-Molekül zunächst durch Infektion stabil in RMA-S-Zellen exprimiert. Dann mußte geklärt werden, ob das zu untersuchende Molekül temperatursensitiv ist, ob es also bei 37 °C zerfällt, wenn es — wie in den RMA-S-Zellen — ohne Peptid, also „leer“ auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Die Stabilität des leeren Moleküls wurde bei 27 °C und 37 °C getestet. Abb. 3.18 zeigt, daß A^f-transfizierte RMA-S-Zellen, die bei 27 °C gehalten wurden, die

Antikörper GN3/2 (einen A^f-reaktiven Alloantikörper) und Ox18 (einen Ratte-MHC-I spezifischen Mausantikörper) besser binden als A^f-transfizierte RMA-S-Zellen, die bei 37 °C inkubiert wurden. Dadurch wurde gezeigt, daß das leere A^f-Molekül temperatursensitiv ist und für diesen Test verwendet werden kann.

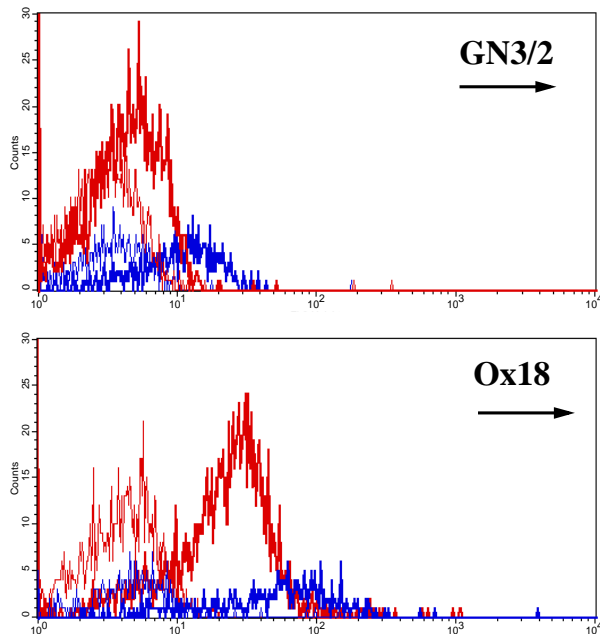


Abbildung 3.18: A^f-Expression der A^f-infizierten RMA-S-Zellen bei 27 °C bzw. 37 °C. Im oberen Teil der Abbildung ist der Alloantikörper GN3/2 gezeigt, im unteren der Ratte-MHC Kl. I-spezifische Mausantikörper Ox18.

RMA-S-Zellen, die bei 37 °C inkubiert wurden, sind als rote Linien gezeigt, diejenigen, die bei 27 °C gehalten wurden, als blaue. Die dünnen Linien stehen für die Färbung mit dem Isotypkontrollantikörper (RIGG oben und Ox18 unten), die dicken für die Färbung mit dem spezifischen Antikörper (GN3/2 und Ox18).

Nachdem die Temperatursensitivität des leeren A^f-Moleküls geklärt wurde, konnte nun die stabilisierende Eigenschaft des Peptids getestet werden:

Wie in Abb. 3.19 zu erkennen ist, führte das OVA-Peptid zu einer Stabilisierung des A^f-Moleküls: A^f-transfizierte RMA-S-Zellen mit OVA-Peptid führen zu einer stärkeren A^f-Oberflächenstabilisierung (gemessen durch GN3/2) als solche ohne Peptid. An untransfizierten RMA-S-Zellen kann ebenfalls – trotz OVA-Zugabe – keine verstärkte Antikörperbindung festgestellt werden. Das bedeutet, daß eine eventuelle Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem Maus-MHC ausgeschlossen werden kann, falls dieser durch das OVA-Peptid ebenfalls stabilisiert wird (Abb. 3.19).

Somit konnte also ein A^f-stabilisierendes Peptid identifiziert und dadurch das von A^f verlangte Peptidmotiv aufgeklärt werden.

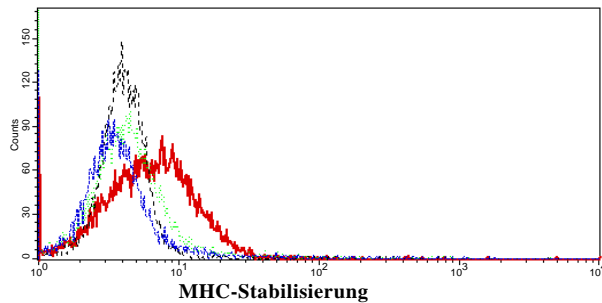


Abbildung 3.19: Stabilisierung der A^f-Expression auf RMA-S-Zellen durch Peptid.

Das OVA-Peptid vermochte die Oberflächenexpression von A^f zu stabilisieren (rote dicke Linie), RMA-S-Zellen ohne Peptidgabe (grüne punktierte Linie) zeigten dagegen keine Ratte-MHC I-Oberflächenexpression. Die Oberflächenexpression wurde dabei mit GN3/2 gemessen. Untransfizierte RMA-S-Zellen mit OVA-Peptid (schwarze gestrichelte Linie) veranlassten keine Bindung des Antikörpers GN3/2, die Färbung A^f-transfizierter RMA-S-Zellen mit OVA-Gabe mit dem Kontrollantikörper RIgG ist ebenfalls negativ (blaue unterbrochene Linie).

3.4 Das MHC Kl. Ia-Molekül der SD-Ratte.

Alle bisherigen Daten weisen auf die Relevanz des A^f -Moleküls gegenüber $A2^f$ in der LEW.1F-Ratte hin: A^f wird von allen getesteten f-reaktiven Alloantikörpern erkannt, $A2^f$ dagegen nur von vier aus zehn. Außerdem wird A^f von RT1^f-reaktiven CTLs erkannt, $A2^f$ hingegen nicht.

Ein weiterer Hinweis kam von Untersuchungen an dem SD-Auszucht-Ratten¹⁴, durch ihn konnte sogar gezeigt werden, daß A^f in der thymischen Selektion V α 8.2-Zellen präferentiell expandiert.

Von einer kooperierenden Arbeitsgruppe aus Babraham wurden Sprague-Dawley Auszucht-Ratten (SD) mit Alloantikörpern typisiert. Sie stellten fest, daß die SD-Ratten entweder homozygot für den MHC I-Haplotyp oder heterozygot für I und f waren.

Diese Ratten wurden uns zur Verfügung gestellt. Dr. Torres-Nagel kreuzte die heterozygoten Ratten zu RT1^f-homozygoten, und sie konnte anschließend durch FACS-Analyse feststellen, daß nur 3 % der CD8-T-Zellen der RT1^f-homozygoten SD-Ratten AV8S2 verwenden. Eine Überselektion findet hier offenbar nicht statt, obwohl durch serologische Typisierungen das Vorhandensein sowohl des f-MHC als auch des TCR-V α 8.2-Segments festgestellt wurde.

Es sollte geklärt werden, warum in diesem Rattenstamm eine geringere Verwendung dieses TCR-V α -Segments zu beobachten ist.

Um zu untersuchen, ob das MHC-I-Molekül der SD-Ratte, obwohl serologisch mit dem der LEW.1F-Ratte identisch, eine Mutation aufweist, die die präferentielle Interaktion mit V α 8.2 verhindern könnte, wurde dieses MHC Kl. I-Molekül kloniert: Dafür wurden aus der SD-Ratte über RT-PCR, wie in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben, mit den Primern EJds/BamHI und Koszus Kl. I-Gene amplifiziert und diese anschließend in den retroviralen Vektor pHIT kloniert.

Die erhaltenen Klone wurden durch cos-Transfektion und Färbung mit A^f - und $A2^f$ -reaktiven Antikörpern weiter charakterisiert (Abschn. 3.2.1). Ein Klon wurde sequenziert.

Die Sequenz des A^{fSD} -Gens weicht von der A^f -Sequenz in folgenden Basen ab: In Exon drei der α 2-Helix gibt es eine Mutation, die zu einer Aminosäuremutation in einer konservierten Region (AS 159) führt. Im zytoplasmatischen Bereich gibt es eine Mutation mit Auswirkung auf Aminosäure-Ebene in Exon sechs und eine Mutation, die sich auf die Nukleotid-Ebene beschränkt, in Exon sieben.

Die Mutationen im zytoplasmatischen Bereich können auf die TCR-Erkennung

¹⁴Auszucht-Ratte sind im Gegensatz zu den sonst verwendeten Inzucht-Ratten genetisch nicht identisch.

keinen direkten Einfluß haben. Sie könnten nur indirekt durch fehlende Interaktion z.B. mit β_2m oder Chaperonen (Tapasin, Calnectin, Calreticulin) die MHC-Expression und damit die TCR-Erkennung beeinflussen. Da die Oberflächenexpression von MHC Kl. I in der SD-Ratte normal ist, sind diese Mutationen aber unbedeutend oder sogar mit höherer Wahrscheinlichkeit PCR-Fehler. Auf die TCR-Erkennung und damit die AV8S2-Zell-Überselektion zumindest können sie keinen Einfluß haben.

Die Mutation AS 159 in Exon drei auf der MHC- $\alpha 2$ -Helix liegt in einer Region, die mit dem TCR interagieren kann (DING et al. 1998). Für den A6-TCR¹⁵ wurde sogar ein Kontakt zwischen CDR1 α des TCR und Y159 des MHC beschrieben (DING et al. 1998). Sie hätte also großen Einfluß auf die TCR-Erkennung.

Da die Alloantikörperreaktivität der SD-Ratte im Vergleich zu derjenigen von LEW.1F nicht verändert ist, obwohl das bei einer Mutation in einem so exponierten Bereich sehr wahrscheinlich wäre, deutet das darauf hin, daß die Mutation 159 ein PCR-Fehler sein könnte. Diese Vermutung wird weiter erhärtet, da die AS-Position 159 – wie bei einem Vergleich von vierzehn Ratte Kl. I-Sequenzen festgestellt werden konnte – konserviert ist.

Unter dieser Annahme ist es unwahrscheinlich, daß eine Mutation in dem A^{fSD} MHC-Molekül der SD-Ratte für das Fehlen der Überselektion verantwortlich ist.

Dr. Torres-Nagel konnte durch einen anderen Ansatz zeigen, daß der RT1-Locus der SD-Ratte zur thymischen Überselektion von V α 8.2 fähig ist. Sie kreuzte unter Beibehaltung des MHC f-Haplotyps die SD-RT1^f-Ratten mehrfach auf LEW-Ratten zurück, so daß der MHC „f“ blieb, der Hintergrund und insbesondere der TCR-Locus aber von der LEW-Ratte stammte. Da die Verwendung von V α 8.2⁺-CD8-T-Zellen daraufhin wieder zunahm (11,5 % für f-homozygote Tiere), konnte so gezeigt werden, daß der MHC-Komplex der SD-Ratte nicht für das Fehlen der AV8S2-Zell-Überselektion verantwortlich ist.

Dr. Torres-Nagel konnte weiterhin zeigen, daß es in den SD-Ratten ein Rearrangementproblem des V α 8.2-Gensegments gibt, das vermutlich für das Fehlen der Überselektion verantwortlich ist.

Mit den durch die SD-Ratte gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, daß der f-Haplotyp MHC der SD-Ratte in der Überselektion funktionell ist und daß das klonierte MHC Kl. I-Molekül der SD-Ratte in der Sequenz höchstwahrscheinlich dem der LEW.1F-Ratte entspricht.

Somit geben diese Daten einen ersten Hinweis darauf, daß das A^f-Molekül, da es auch in der SD-Ratte gefunden werden konnte, präferentiell mit V α 8.2-positiven CD8-T-Zellen interagiert.

¹⁵A6/HLA-A2/Tax ist einer der TCR/pMHC-Komplexe, deren Struktur bekannt ist (siehe Einleitung).

3.5 Präferentielle Interaktion von V α 8.2-CD8-T-Zellen mit A^f.

Eine Aufgabe dieser Arbeit war es zu prüfen, ob das klonierte A^f- oder das A2^f-Molekül bevorzugt AV8S2-exprimierende CD8-T-Zellen expandiert, also präferentiell von ihnen erkannt wird.

Dazu wurden mehrere Ansätze verfolgt: Einerseits wurde untersucht, ob V α 8.2-positive CD8-T-Zellen in einer MLR präferentiell durch A^f-transfizierte „Trägerzellen“ zur Proliferation angeregt werden (Abschn. 3.5.3).

Andererseits wurde geprüft, ob V α 8.2-exprimierende CD8-T-Zellen präferentiell A^f-exprimierende Zielzellen lysieren. Für den zweiten Ansatz wurden zwei Strategien angewandt, um die V α 8.2-Effektorzellen aus der Gesamtpopulation aller CD8-T-Zellen auszuwählen und zu aktivieren:

Durch „Panning“ mit einem monoklonalen Antikörper, der nur AV8S2-T-Zellen erkennt (ca. 2 % der CD8-T-Zellen der LEW-Ratte, s. Abb. 3.1), können polyklonal alle V α 8.2-Zellen selektiert und gleichzeitig auch aktiviert werden. Eine diesem polyklonalen AV8S2-Repertoire innewohnende präferentielle A^f-Erkennung wäre sichtbar, wenn die AV8S2-Zellen A^f besser erkennen als andere Ratte-MHC-I-Moleküle, die Gesamtheit der T-Zellen aber – durch Panning mit einem pan-TCR-Antikörper aktiviert – A^f nicht bevorzugt erkennt. Hier würde also die (präferentielle) Interaktion einer Teilmenge der T-Zellen (die V α 8.2⁺-TCs) verglichen mit der Reaktion der Gesamtheit aller T-Zellen mit A^f (Abschn. 3.5.1).

Die RT1^f-alloreaktiven V α 8.2-CD8-T-Zellen können mit einem anderen Ansatz analysiert werden: Die Aktivierung der Effektoren erfolgt in diesem Fall in einer MLR gegen LEW.1F-Stimulatoren, die Selektion der V α 8.2-exprimierenden T-Zellen erst später durch die Trennung von V α 8.2-positiven und -negativen alloreaktiven T-Zellen durch den FACSort (Abschn. 3.5.2).

Dabei zeigt die erste Strategie des zweiten Ansatzes das „unvoreingenommene“ polyklonale Repertoire an V α 8.2-CTLs und vergleicht dieses mit der Gesamtheit aller T-Zellen, die beliebige V-Segmente verwenden. Die zweite Strategie untersucht den Teil des Repertoires an V α 8.2-Zellen, der durch den f-Haplotyp aktiviert wurde und daher alloreaktiv ist, und vergleicht ihn mit V α 8.2-negativen RT1^f-alloreaktiven CTLs.

3.5.1 Generierung polyklonaler A^f-spezifischer CTLs mittels „Panning“.

Mit diesem Ansatz sollte überprüft werden, ob eine präferentielle Interaktion polyklonaler V α 8.2-T-Zellen mit A^f stattfindet, nicht aber AV8S2-negativer T-Zellen.

Dafür wurden AV8S2-Zellen mittels Panning mit einem V α 8.2-spezifischen Antikörper selektiert und aktiviert. Gesamt-T-Zellen wurden – nach V α 8.2-Depletion – durch Panning mit einem pan-TCR-Antikörper aktiviert. Überprüft wurde die mögliche präferentielle A^f-Erkennung der AV8S2-positiven CTLs durch die Lyse des LEW-THO 35/1, das eingebrachte Ratte-MHC-I-Moleküle exprimiert.

Abb. 3.20 deutet darauf hin, daß V α 8.2-exprimierende Effektoren das A^f-transfizierte THO35/1 besser lysierten als das A^a-transfizierte. Hingegen erkannten mit anti-TCR-Panning aktivierte Effektoren das A^f- und das A^a-infizierte THO 35/1 gleich gut.

Da es mit dieser Methode nur möglich war, entweder genügend T-Zellen zu gewinnen, die zwar Blasten – also aktiviert – waren, aber nicht zur vollen Effektorfunktion (Lyse) fähig waren, oder potente Effektoren, deren Zellzahl aber zu gering war, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern¹⁶, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

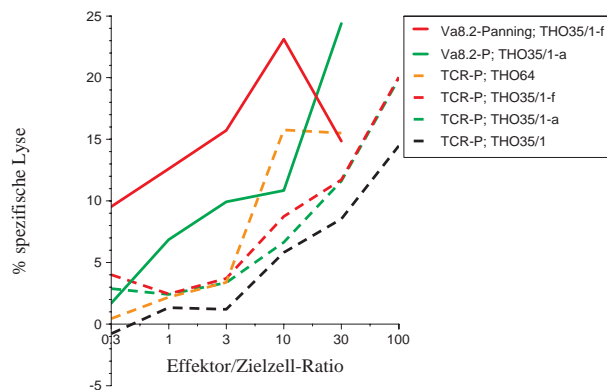


Abbildung 3.20: Erkennung von Kl. I-transfizierten THOs durch polyklonal aktivierte V α 8.2⁺- bzw. V α 8.2⁻-Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.

Die Effektoren wurden durch Panning mit einem Ak gegen das V α 8.2-TCR-Segment (V α 8.2-P) bzw. – nach V α 8.2-Depletion – durch Panning mit einem pan-TCR-Antikörper (TCR-P) gewonnen und aktiviert. THO64 ist ein LEW.1F-THO, THO35/1 ist ein LEW-THO.

¹⁶So beruht auch jeder Punkt der Abb. 3.20 auf nur einem Meßwert und nicht – wie üblich – auf Triplikaten.

3.5.2 Generierung alloreaktiver A^f-spezifischer CTLs mittels MLR.

Mit diesem Ansatz sollte untersucht werden, ob diejenigen unter den RT1^f-alloreaktiven T-Zellen, die das V α 8.2-Segment verwenden, A^f – im Vergleich zu anderen Ratte-MHC-I-Molekülen – präferentiell erkennen, nicht aber alloreaktive T-Zellen, die AV8S2 nicht exprimieren.

Dafür wurden LEW-Rattenzellen in einer MLR mit LEW.1F-Rattenzellen stimuliert, an Tag fünf in V α 8.2-Segment-positive und -negative Zellen sortiert und an Tag neun restimuliert. Nach weiteren fünf Tagen wurden den so erhaltenen Effektoren Ratte-Kl. I-infizierte Zielzellen angeboten und es wurde überprüft, ob die V α 8.2-Segment-positiven Zellen A^f-infizierte Zielzellen präferentiell lysieren und ob V α 8.2⁻-T-Zellen das auch bewirken.

Da trotz sehr guter Stimulation mit einem hohen Prozentsatz an V α 8.2⁺-CD8-T-Zellen¹⁷ nach dem Sortieren nur sehr wenige Zellen übrig blieben, erschien dieser Ansatz nicht durchführbar und wurde nicht weiter verfolgt.

3.5.3 Präferentielle Expansion von V α 8.2-CD8-T-Zellen bei Stimulierung mit A^f-exprimierenden Zelllinien in einer MLR.

Um eine mögliche präferentielle Interaktion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen mit A^f zu untersuchen, wurden hier LEW-CD8-T-Zellen in einer MLR mit Ratte-MHC-Kl. I-exprimierenden Zelllinien/THOs stimuliert und die Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen mit der aller CD8-T-Zellen verglichen. Eine präferentielle AV8S2-Expansion ist erkennbar, wenn die AV8S2-Zellen in den Blasten – den Zellen, die auf den Allo-MHC mit Proliferation reagiert haben – zu einem höheren Prozentsatz vertreten sind als in den kleinen Zellen, die nicht reagiert haben. Des Weiteren wurde die unterschiedliche Expansion von V α 8.2-CD8-T-Zellen bei Stimulation mit den einzelnen MHC-Haplotypen verglichen.

Zunächst wurden transfizierte L-Zellen – eine häufig für Maus-MLRs verwendete Zelllinie (NAKATSUJI et al. 1987) – als Stimulatoren verwendet. Wie in Tabelle 3.2 zusammengefaßt zu sehen ist, bewirkten A^f-transfizierte L-Zellen in jedem der Versuche die stärkste Expansion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen.

Der Versuch L4a ist in Abb. 3.21 auch graphisch dargestellt und soll hier exemplarisch erklärt werden: V α 8.2-positive CD8-T-Zellen proliferierten bei Stimulation mit A^f-transfizierten L-Zellen stärker als AV8S2-negative CD8-T-Zellen, nicht jedoch bei Stimulation mit untransfizierten L-Zellen oder solchen, die mit

¹⁷Eingesetzt wurden $3,5 \times 10^8$ Zellen mit 2,5 % V α 8.2-Expression insgesamt. Bei einer erwarteten Ausbeute von 60 % nach dem Sortiervorgang sollten dennoch ca. 5×10^6 Zellen erzielt werden. Nach dem Sortieren bleiben allerdings nur $3,5 \times 10^5$ Zellen übrig.

anderen Ratte-MHC-I-Molekülen transfiziert wurden. Das LEW.1F-THO64, das hier als Positivkontrolle verwendet wurde, stimulierte die stärkste präferentielle Expansion von V α 8.2⁺-CD8-T-Zellen.

Diese Daten zeigen, daß V α 8.2⁺-CD8-T-Zellen bei Allostimulation mit A^f präferentiell expandieren.

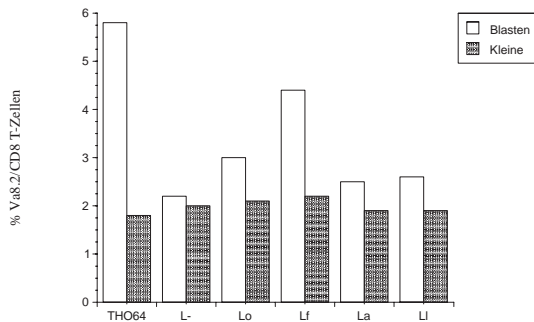


Abbildung 3.21: MLR von LEW-LN-CD8-T-Zellen gegen Ratte-Kl. I-transfizierte L-Zellen bzw. das LEW.1F-THO64 (Versuch L4a).

Die dunklen Balken kennzeichnen die im FSC/SSC kleinen Zellen, die hellen Balken die Blasten. Gezeigt ist der Anteil von V α 8.2-exprimierenden CD8-T-Zellen an allen CD8 T-Zellen.

Insgesamt aber waren die mit transfizierten L-Zellen erreichten Unterschiede in der Expansion von V α 8.2⁺-CD8-T-Zellen zu gering für die spätere Kartierung der für die Überselektion verantwortlichen Stellen auf A^f.¹⁸ Der für A^f wenig geeignete Peptidtransporter (TAP¹⁹) der Maus-L-Zellen könnte für diese bei L-Zellen nur mäßige präferentielle Expansion verantwortlich sein: Das TAPA-Allel der Ratte, nicht aber ihr TAPB-Allel oder Maus-TAP, ist fähig, MHC-Moleküle mit sehr saurer F-Tasche, wie A^a, mit passenden Peptiden mit positivem C-Terminus zu beladen. A^f nun zeigt nicht nur sehr ähnliche Peptidbindungsanforderungen wie A^a (Abschn. 3.3.3, S. 77), auch stimmt die F-Tasche, die für das TAP-Phänomen ausschlaggebend ist, in beiden Molekülen völlig überein. Daher ist A^f vom TAP-Allelismus voraussichtlich genauso betroffen wie A^a.

Weiterhin führt die Koexpression des A^a-Moleküls mit dem falschem TAP-Allel zu einer veränderten TC-Alloerkennung²⁰ (LIVINGSTONE et al. 1991). Genau in der Alloerkennung aber soll die präferentielle Interaktion der V α 8.2-T-Zellen mit A^f gezeigt werden. Daher sollte ein *in vitro*-Ansatz auf das TAP-Allel

¹⁸Mit blockierenden Antikörpern gegen den Maus-MHC der L-Zellen konnte in diesen Versuchen nicht gearbeitet werden, da die Responderzellen den Antikörper unspezifisch aufnahmen und für eine FACS-Analyse mit unkonjugiertem anti-V α 8.2-Antikörper daher nicht verwendbar waren (Daten nicht gezeigt).

¹⁹TAP transportiert die im Zytosol generierten Peptide in das ER, wo sie mit MHC-I assoziieren.

²⁰Alloreaktive CTLs unterscheiden zwischen A^a im TAPA- und im TAPB-Hintergrund.

Ver- suchs- num- mer	Respon- derzel- len	Stimu- lations- dauer	IL-2 in U/ml	Stimula- torzellen	% V α 8.2 ⁺ / CD8 ⁺ - Blasten
L1a	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	L-l L-f	2,0; n=3 2,8
L1b	T-Zellen	5 d	100 U	L-l L-f	1,9; n=3 4,0
L2	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	L L-1o L-a L-f	1,9; n=5 1,4 pool 1,9 2,6
L3	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	L-l L-1o L-a L-f	3,7; n=5 3,6 2,2 4,1
L4a*	CD8-T- Zellen	3 d	100 U	L- L-l L-1o L-a L-f	2,2 2,6 3,0 2,5 4,4
L4b	CD8-T- Zellen	6 d	100 U	L- L-l L-1o L-a L-f	1,1 1,7 1,6 1,6 1,9

Tabelle 3.2: Tabelle der MLRs von LEW-LN-Responderzellen gegen L-Stimulatorzellen, ggf. transfiziert mit Ratte-MHC-I-Genen.

*: dieser Versuch ist auch als Graphik dargestellt.

n: Anzahl von Parallelansätzen.

zurückgreifen, mit dem die präferentielle AV8S2/A^f-Interaktion beobachtet wurde, also auf das Ratte TAPA-Allel, das in der LEW-Ratte exprimiert wird (JOLY et al. 1994).

So bot es sich an, die LEW-T-Zellhybridome THO35/1 und 53/4 als Stimulatorzellen für eine MLR zu verwenden, weil sie u.a. das passende Ratte-TAP-Allel exprimieren²¹. Da sich diese THOs nicht konventionell transfizieren ließen, mußten A^a, A^f und A2^f in den retroviralen Vektor pLEN umklontiert werden (s. Abschn. 3.2.3). Mit diesem Vektor ließen sich die THOs infizieren.

Trotz ausführlicher Titrationsreihen der Zellzahl von Stimulator- und Responderzellen, der IL-2-Konzentration und der Dauer der Stimulation, erwiesen sich die THOs letztlich als sehr schlechte Stimulatoren. Die Varianz innerhalb eines Versuchs (bei Parallelansätzen) war sehr hoch und die Kontrollfärbung mit dem Isotypantikörper unsauber, da es viele tote Zellen gab, die als unspezifische Färbung sichtbar wurden. Auszüge dieser Versuche sind in der Tabelle 3.3 zu sehen. Den Versuch T4a zeigt auch die nachfolgende Graphik. Da sich die THOs damit als ungeeignet zur Stimulation von MLRs erwiesen, wurde von ihrer weiteren Verwendung abgesehen.

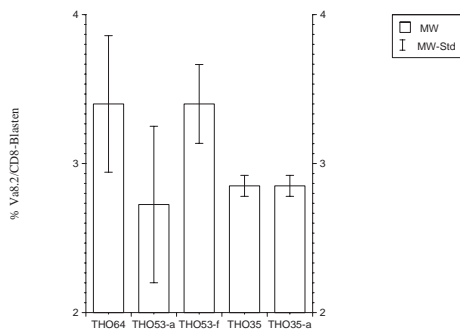


Abbildung 3.22: MLR von LEW-LN-CD8-T-Zellen gegen das LEW.1F-THO (THO64) und gegen A^a- und A^f-infizierte LEW-THOs (THO53/4-a, -f und THO35/1-a, -f; Versuch T4a).

²¹Maus/Ratte-THOs exprimieren sowohl das Maus-TAP wie auch das Ratte-TAPA. TAPA ist dominant über TAPB (LIVINGSTONE et al. 1991).

Ver- suchs- num- mer	Respon- derzel- len	Stimu- lations- dauer	IL-2 in U/ml	Stimula- torzellen	% V α 8.2 ⁺ / CD8 ⁺ - Blasten
T1	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	THO64 THO35/1 THO53/4	4,2 1,3 2,6
T2a	CD8-T- Zellen	3 d	100 U	THO64 THO35/1 THO53/4	5,8; n=2-3 3,9 3,8
T2b	CD8-T- Zellen	6 d	100 U	THO64 THO35/1 THO53/4	4,1; n=2-3 2,2 2,3
T3	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	THO64 THO35/1 THO35/1-a THO35/1-f THO53/4 THO53/4-a THO53/4-f	3,1; n=3 3,3 3,2 2,9 3,4 2,9 3,1
T4a*	CD8-T- Zellen	3 d	100 U	THO64 THO35/1 THO35/1-a THO53/4-a THO53/4-f	3,4; n=3 2,9 2,6 2,7 3,4
T4b	CD8-T- Zellen	5 d	100 U	THO64 THO35/1 THO35/1-a THO53/4-a THO53/4-f	3,9; n=3 2,6 2,6 2,8 2,7
T5a	CD8-T- Zellen	4 d	100 U	THO64 THO35/1 THO53/4	3,8; n=3 2,5 2,0
T5b	CD8-T- Zellen	7 d	100 U	THO64 THO35/1 THO53/4	2,9; n=3 1,6 1,8

Tabelle 3.3: Tabelle der MLRs von LEW-LN-Responderzellen gegen T-Zellhybridome, ggf. infiziert mit Ratte-MHC-Kl.I-Genen.

THO64 ist ein LEW.1F-T-Zellhybridom, THO35/1 und THO53/4 sind LEW-T-Zellhybridome.

L-Stimulatorzellen, ggf. transfiziert mit Ratte MHC Kl. I-Genen.

*: dieser Versuch ist auch als Graphik dargestellt.

n: Anzahl von Parallelansätzen.

Zu dieser Zeit hatte eine Gruppe aus Japan das Ratte-CD80-Molekül kloniert und es in Maus-Mastzellen (P815) transfiziert (MAEDA et al. 1997). Sie stellten uns diese Zelllinie freundlicherweise zur Verfügung. Diese Zellen exprimierten zwar wiederum das weniger geeignete Maus-TAP, aber sie boten – aufgrund der CD80-Expression – eine für die Ratten-Responderzellen optimale Kostimulation, einen für MLRs sehr wichtigen Faktor (IEZZI et al. 1998)²².

Diese Ratte-CD80-transfizierten Maus-Mastzellen wurden mit den einzelnen Ratte-MHC-Kl. I-Konstrukten infiziert (A^f, A^a und A2^f), es wurden Einzelklone gewonnen und deren MHC-I-Expression analysiert: Mit dem Isotypkontrollantikörper gefärbt, zeigten alle Linien einen sehr ähnlichen Hintergrund. CD80 wurde in allen Zelllinien sehr stark und in vergleichbarer Höhe exprimiert. Das infizierte A^a-MHC-Molekül wurde genauso stark wie das A^f-Molekül exprimiert, A2^f aber weniger stark. Obwohl viele Klone getestet worden waren, war es nicht möglich gewesen, einen höher exprimierenden A2^f-Klon zu finden (Abb. 3.23).

Mit diesen Ratte-CD80-transfizierten Ratte-MHC Kl. I-infizierten Mausmastzellklonen konnte schließlich eine Stimulation mit geringer Varianz innerhalb eines Versuchs und sehr sauberen Färbungen (wenig tote Zellen) erzielt werden (siehe zusammenfassend auch Tab. 3.4).

Versuch P6 ist auch graphisch dargestellt und soll exemplarisch für die mit der Mausmastzelllinie P815 erzielten Ergebnisse erläutert werden: Abb. 3.24 zeigt, daß der A^f-exprimierende P815-rCD80 (abgekürzt als P80)-Klon eine präferentielle Expansion von V α 8.2⁺-CD8-Blasten provozierte, hingegen nicht untransfizierte Maus-Mastzellen oder solche, die A^a oder A2^f exprimierten. Vielmehr bewirkten letztere sogar eine verminderte Expansion von V α 8.2⁺-verwendenden CD8-T-Zellen (vergleiche Abb. 3.25).

Damit wurde nachgewiesen, daß das A^f-Molekül präferentiell V α 8.2-exprimierende CD8-T-Zellen in der Alloreaktion expandiert. Für das A2^f-Molekül konnte das nicht gezeigt werden. Gemeinsam mit den für die Alloerkennung im Zytotoxizitätstest für A2^f gewonnenen Daten kann das A2^f-Molekül in seiner Eigenschaft als möglicher Kandidat für die Überselektion von V α 8.2-Zellen ausgeschlossen werden.

Somit ist A^f als das Molekül identifiziert, das die präferentielle Expansion von AV8S2-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion stimuliert.

²²Bislang wurde eine Kostimulation durch Gabe von humanem Il-2 bewirkt.

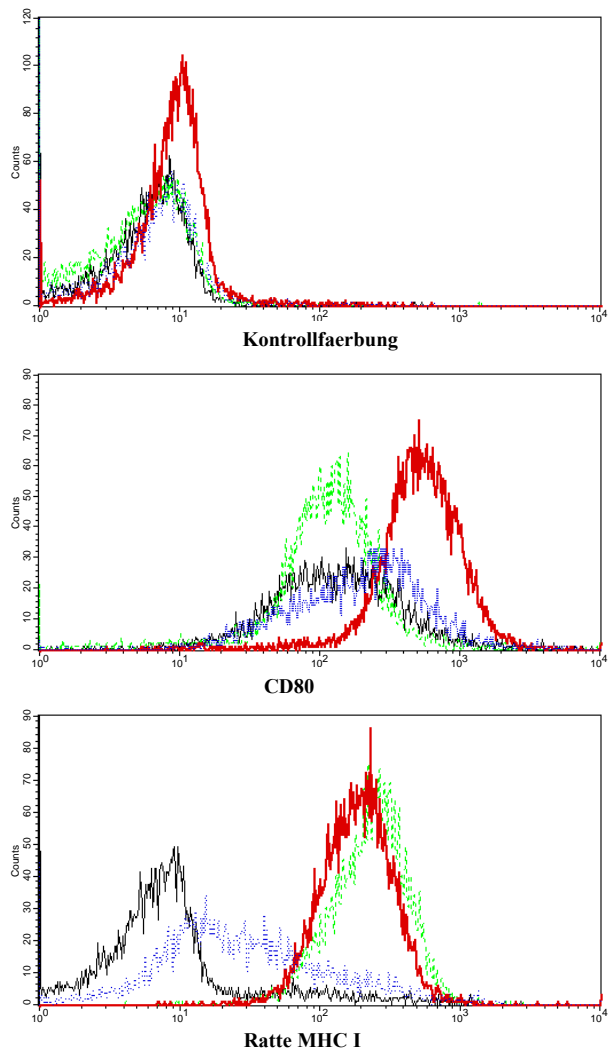


Abbildung 3.23: Färbung der Ratte-MHC Kl. I-infizierten P815-rCD80-Klone mit dem Isotypkontrollantikörper bzw. Expression von Ratte-CD80 und Ratte-MHC-I.

Die schwarze dünne Linie zeigt die untransfizierten P815-rCD80-Zellen. Der A^a-infizierte P815-rCD80-Klon ist als grüne unterbrochene Linie dargestellt, der A^f-infizierte als dicke rote Linie, der A2^f-infizierte als gepunktete blaue Linie.

Ver- suchs- num- mer	Respon- derzel- len	Stimu- lations- dauer	IL-2 in U/ml	Stimulator- zellen	% V α 8.2 ⁺ / CD8 ⁺ - Blasten
P1	T-Zellen	5 d	100 U IL-2	P815-rCD80	1,1
			10 U IL-2	P815-rCD80	0,8
			Il-2 d3	P815-rCD80	1,1
			- IL-2	P815-rCD80	0,8
			100 U IL-2	P815-rCD80-f	1,2
			10 U IL-2	P815-rCD80-f	1,4
			Il-2 d3	P815-rCD80-f	0,3
			- IL-2	P815-rCD80-f	3,5
P2	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80	1,1; n=8
				P815-rCD80-f	2,1
P3	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80-a	1,8; n=8
				P815-rCD80-f	1,7
P4	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80	1,2; n=4
				P815-rCD80-a	1,4
				P815-rCD80-2f	1,2
				P815-rCD80-Hf/a	2,1
P5	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80	1,0; n=7
				P815-rCD80-f	4,0
				P815-rCD80-Ha/f	2,0
P6*	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80	0,8; n=6
				P815-rCD80-a	1,0
				P815-rCD80-f	4,2
				P815-rCD80-2f	1,0
P7*	T-Zellen	5 d	-	P815-rCD80	1,2; n=7
				P815-rCD80-a	1,4
				P815-rCD80-f	4,0
				P815-rCD80-Ha/f	2,6
				P815-rCD80-Hf/a	2,9

Tabelle 3.4: Tabelle der MLRs von LEW-LN-Responderzellen gegen P815-rCD80 Stimulatorzellen, ggf. infiziert mit Ratte-MHC Kl. I-Genen.

H: Hybrid a/f, Hybrid f/a, relevant für Kapitel 3.6

*: dieser Versuch ist auch als Graphik dargestellt.

n: Anzahl von Parallelansätzen.

3.5 PRÄFERENTIELLE INTERAKTION VON V α 8.2-CD8-T-ZELLEN MIT A^f. 92

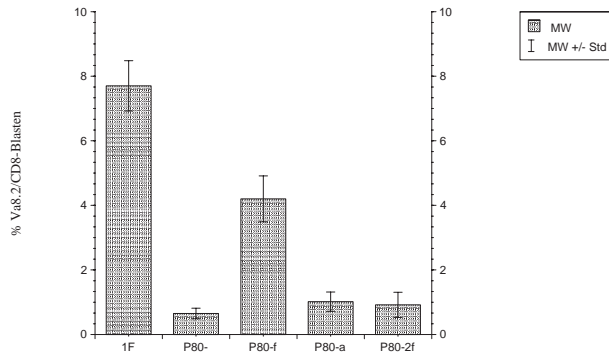


Abbildung 3.24: MLR von LEW-LN-T-Zellen gegen Ratte-Kl. I-transfizierte P815-rCD80-Zellen. Nur die Blasten sind gezeigt (Versuch P6).

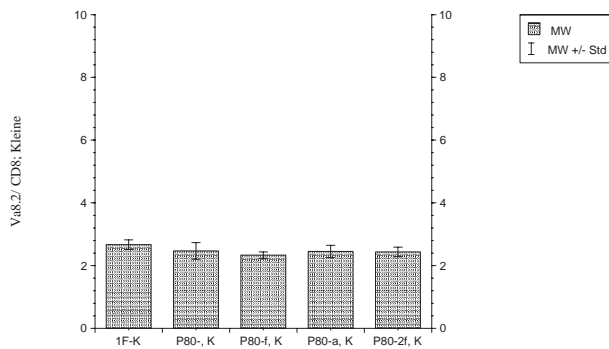


Abbildung 3.25: MLR von LEW-LN-T-Zellen gegen Ratte-Kl. I-transfizierte P815-rCD80-Zellen. Nur die kleinen, nicht reagierenden Zellen sind gezeigt (Versuch P6).

3.6 Kartierung der A^f/Vα8.2-Interaktion.

3.6.1 Das A^a-Molekül.

Das zweite Anliegen dieser Arbeit nach der Klonierung und Charakterisierung des Moleküls, das für die Überselektion von Vα8.2⁺-CD8-T-Zellen verantwortlich ist, war es, die Regionen bzw. Aminosäuren auf A^f zu kartieren, die für diese Überselektion von Bedeutung sind.

Hierfür war die schon beschriebene Ähnlichkeit des A^f-Moleküls mit dem A^a-Molekül sehr hilfreich: Diese MHC-Proteine unterscheiden sich extrazellulär nur in sieben Aminosäuren. Da nur A^f nicht aber A^a eine Überselektion bewirkt (TORRES-NAGEL et al. 1994), müssen die Aminosäuren, in denen sich die beiden Moleküle unterscheiden, für die Überselektion ausschlaggebend sein. Es war unser Anliegen, deren Einfluß auf eine präferentielle Expansion von Vα8.2⁺-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion zu untersuchen.

In der Tabelle 3.5 sind die Aminosäuren aufgeführt, die extrazellulär zur Unterscheidung von A^a und A^f führen. Wenn für diese Aminosäurepositionen bereits TCR- bzw. Peptid-Kontakte beschrieben waren, sind diese ebenfalls angegeben:

Die Aminosäuren 63 und 70, die zu den Peptidbindungstaschen des MHC-Moleküls gehören, können indirekt über das Spektrum gebundener Peptide Einfluß auf die TCR-Erkennung ausüben (MATSUMURA et al. 1992; FREMONT et al. 1992): Durch Selektion unterschiedlicher Peptidspektren können sie die TC-Erkennung beeinflussen, a) weil der TCR veränderte Peptidaminosäuren sieht oder auch b) weil eine Bindung eines andern Peptids eine Änderung der MHC-Konformation bewirken kann (MADDEN 1995) und der TCR so ein verändertes MHC-Molekül erkennt.

Direkte Kontakte zu der TCRα-Kette wird den AS 62, 65, 69 und 167 zugeschrieben (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998). Sie könnten zu einer präferentiellen Interaktion von A^f mit dem Vα8.2-TCR-Segment führen und damit die Überselektion bedingen. Dabei fällt die Vielzahl der potentiellen TCRα-Kettenkontakte der Aminosäuren 65 (Region I) und 167 (Region II) besonders auf (Tab. 3.5).

Wird das A^f-Molekül aus dem Blickwinkel des TCR betrachtet, liegen die A^f von A^a unterscheidenden Aminosäuren auf zwei Regionen verteilt, eine N-terminal auf der MHC-α1-Helix („Region I“) und die andere am C-Terminus der MHC-α2-Helix („Region II“, s. Abb. 3.26, A). Beide Regionen befinden sich auf der „linken Seite“²³ des MHC-Moleküls, genau dort, wo die Vα-Kette des TCR

²³Wenn MHC-Moleküle aus dem Blickwinkel des TCR gezeigt werden, ist das MHC-Molekül konventionell so gezeigt, daß die MHCα1-Helix oben liegt, so daß der Peptid N-Terminus, ebenso wie die beiden hier betrachteten Regionen, links liegt (vgl. Abbb. 3.26 und 1.10, S. 25).

Aminosäureposition A ^f → A ^a	MHC-Helix/ Region	Interaktion	Referenz
62 E → Q	α1	mit TCR: ein Kontakt zu CDR3α (B7) bzw. vier Kontakte zu CDR1α und ein Kontakt zu CDR3α (2C)	(DING et al. 1998; GARCIA et al. 1998; GARBOCZI et al. 1996; SMITH und LUTZ 1997; WITTE et al. 1997)
63 E → Q	α1/I	mit Peptid: Tasche A/B	(MATSUMURA et al. 1992; FREMONT et al. 1992)
65 Q → R	α1/I	mit TCR: vier Kontakte zu CDR3α (A6) bzw. zehn Kontakte zu CDR3α und zwei Kontak- te zu CDR2β (B7) bzw. ein Kontakt zu CDR3α (2C)	(GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998; GARCIA et al. 1998; SMITH und LUTZ 1997)
69 G → E	α1/I	mit TCR: ein Kontakt zu CDR3α (bei A6 und B7)	(GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998; SMITH und LUTZ 1997)
70 H → W	α1/I	mit Peptid: Tasche B/C	(MATSUMURA et al. 1992; FREMONT et al. 1992)
167 S → W	α2/II	mit TCR: ein Kontakt zu CDR1α (A6) bzw. vier Kontakte zu CDR1α (B7)	(GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998; SMITH und LUTZ 1997; WITTE et al. 1997)
169 R → S	α2/II	-	-

Tabelle 3.5: Eine Auflistung der sieben Aminosäuren, die A^a von A^f extrazellulär unterscheiden. Die CDR1α-Kontakte sind durch Unterstreichung und Fettdruck hervorgehoben. Für „Region I,“ sind insgesamt fünfundzwanzig TCR-Kontakte beschrieben, für „Region II“ aber nur fünf. Allerdings ist die Anzahl der beschriebenen CDR1α-Kontakte beider Regionen ähnlich (vier gegenüber fünf).

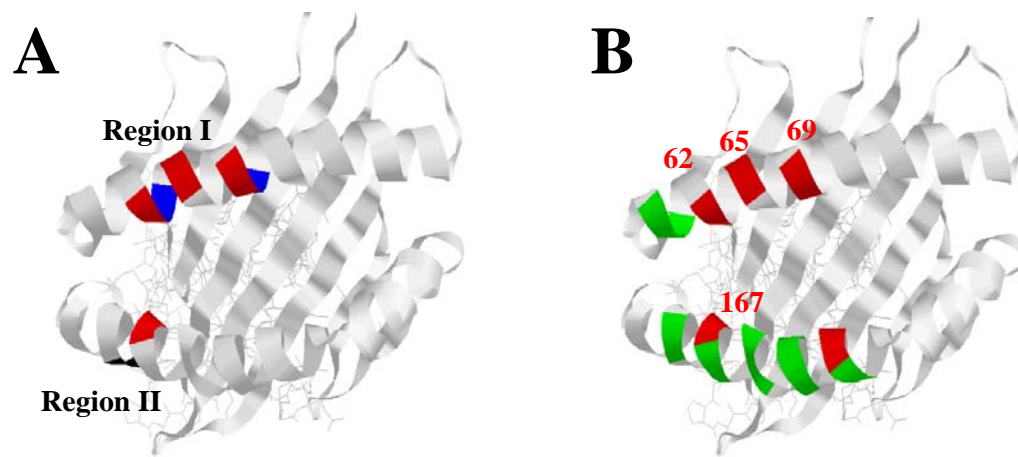


Abbildung 3.26: RT1.A^f; **Im Teil A** sind die AS markiert, die A^f von A^a unterscheiden. In Rot sind AS des MHC markiert, die – nach Garboczi et al. 1996, Garcia et al. 1998 und Ding et al. 1998 – den TCR kontaktieren (62, 65, 69, 167), in Blau diejenigen (63, 70), für die Peptidkontakte beschrieben sind (SMITH und LUTZ 1997; WITTE et al. 1997), und in Schwarz ist eine AS (169), für die keine TCR- oder Peptidkontakte bekannt sind.

Im Teil B sind die von der TCR V α -Kette kontaktierten MHC-AS hervorgehoben. Rot markiert sind dabei polymorphe Positionen von MHC-I der Ratte (JOLY et al. 1998), grün konservierte.

Im Vergleich der beiden Bilder läßt sich gut erkennen, daß von fünf überhaupt vorhandenen TCR α -kontaktierenden polymorphen AS (B) vier auch in den unterscheidenden AS enthalten sind (A).

den MHC kontaktiert. Das läßt sich gut in Abbildung 3.26 erkennen. In Teil A der Abbildung sind die Aminosäuren hervorgehoben, die die beiden MHC-Moleküle unterscheiden. In Rot sind diejenigen markiert, die gemäß Tabelle 3.5 vom TCR kontaktiert sind, in Blau diejenigen, die Einfluß auf die Peptidbindung haben, und die Aminosäure 169 – für diese Position wurden keine TCR- oder Peptid-Kontakte beschrieben – in Schwarz. In Teil B der Abbildung sind die Aminosäuren, die nach Garboczi et al. 1996, Garcia et al. 1998 und Ding et al. 1998 von der TCR α -Kette kontaktiert werden, hervorgehoben. Wichtig sind hierbei v.a. die rot markierten polymorphen MHC-Reste, da ja nur sie zur Unterscheidung von A^a und A^f beitragen können. Die konservierten TCR α -kontaktierten MHC-Reste sind grün hervorgehoben.

Nur die fünf rot markierten Aminosäuren kommen also für eine präferentielle Interaktion eines $V\alpha$ -Segments mit einem Ratte-Ia-Molekül in Frage. Wie sich im Vergleich der beiden Teilabbildungen mit einem Blick erkennen läßt, sind vier davon in den wenigen Unterschieden von A^a zu A^f verwirklicht.

Diese vier Aminosäuren sind topologisch gesehen also sehr wahrscheinlich Kandidaten für eine präferentielle Interaktion von $V\alpha 8.2$ mit A^f .

Die Aminosäurekombination von „Region I“ auf der $\alpha 1$ -Helix kommt außer in A^f in keinem anderen der vierzehn untersuchten Ratte-MHC Kl. Ia-Moleküle mehr vor. Die Aminosäurekombination von „Region II“ auf der $\alpha 2$ -Helix dagegen ist weit verbreitet. Sie ist auch in $A^{1c,2c,2o}$ und A^u vorhanden und damit in fünf von vierzehn analysierten Ratte-MHC-I-Sequenzen. Daher wurde zunächst vermutet, daß „Region I“ hauptverantwortlich für die präferentielle Expansion von AV8S2-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion sein könnte und in dieser Region möglicherweise die Aminosäure 62, da für diese CDR1 α -Kontakte beschrieben sind (nur CDR1 α und CDR2 α sind AV8S2-codiert).

Es sollte also getestet werden, wie stark die einzelnen Aminosäuren, die das zur präferentiellen AV8S2-Zell-Expansion befähigte A^f -Molekül von dem dazu nicht fähigen A^a -Molekül unterscheiden, zu dieser präferentiellen Expansion beitragen. Vor Einführung von Punktmutationen an den einzelnen Aminosäurepositionen sollte aber zunächst der Einfluß dieser Regionen insgesamt auf die präferentielle AV8S2-Zell-Expansion untersucht werden. Dafür wurden Hybridmoleküle aus A^a und A^f konstruiert.

3.6.2 Klonierung von Hybriden aus A^a und A^f .

Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es, zu sehen, ob eine der beiden Regionen, die das nicht überselektierende Molekül A^a von A^f – dem Molekül, das $V\alpha 8.2^+$ -CD8-T-Zellen bevorzugt expandiert – unterscheiden, für diese präferentielle Expansion in der Alloreaktion verantwortlich gemacht werden kann.

Deswegen wurden durch eine Klonierung Hybride, die teils A^a und teils A^f

sind, generiert. Diese Hybride wurden anschließend in ihrer Fähigkeit getestet, eine präferentielle AV8S2-Zell-Expansion in der Alloreaktion zu stimulieren (Abb. 3.27).

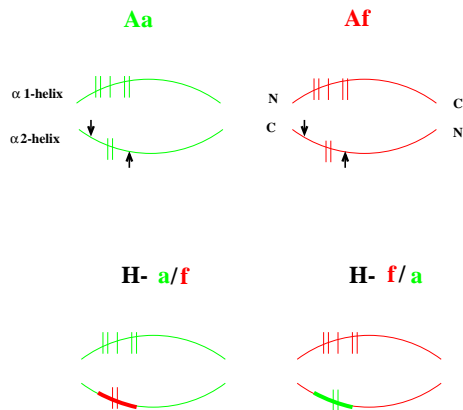


Abbildung 3.27: Schema der Konstruktion der Hybridmoleküle. Im oberen Teil der Abbildung ist schematisch das A^f-Molekül rot dargestellt und das A^a-Molekül grün. Die Aminosäuren, die diese beiden Moleküle unterscheiden, sind als vertikale Linien angedeutet. Die Pfeile kennzeichnen die Restriktionsschnittstellen zum Herausschneiden von „Region II“. In der unteren Hälfte der Abbildung sind die nach dem reziproken Austausch von „Region II“ entstandenen Hybridmoleküle skizziert.

Die Sequenzen beider Moleküle wurden nach Restriktionsschnittstellen abgesehen, und es wurden zwei Enzyme gefunden, mit denen es möglich war, „Region II“ auf der MHC-α2-Helix auszuschneiden: *PmaCI*, auch *Eco721* genannt, schneidet in beiden Molekülen einmal vor „Region II“, *SdaI*, auch *Sse8387I* genannt, schneidet in beiden Molekülen einmal nach „Region II“.

Mit Hilfe dieser beiden Restriktionsenzyme war es also möglich, „Region II“ aus A^a und A^f herauszuschneiden und reziprok vertauscht wieder einzusetzen (Abb. 3.28).

Zur Unterscheidung der zwei Hybride untereinander und von den Ausgangsmolekülen wurde einerseits die unterschiedliche Länge der Ausgangsmoleküle bei einer *XbaI/NotI*-Restriktion herangezogen, andererseits die unterschiedliche Zugänglichkeit bezüglich des Restriktionsenzym *Bpu1102I*:

XbaI und *NotI* schneiden das hineinklonierte MHC-Molekül wieder heraus. Da A^a mit den von Joly et al. 1995 beschriebenen Primern kloniert wurde, die nur die codierende Sequenz ohne Leader amplifizieren, ist es nur 1,2 kb lang. A^f dagegen wurde mit den von Wang et al. 1996a beschriebenen Oligonukleotiden kloniert, so daß hier die komplette 3′-untranslatierte Region vorliegt, und ist daher 1,6 kb lang.

Das Restriktionsenzym *Bpu1102I* schneidet „Region II“ nur des A^a-, nicht

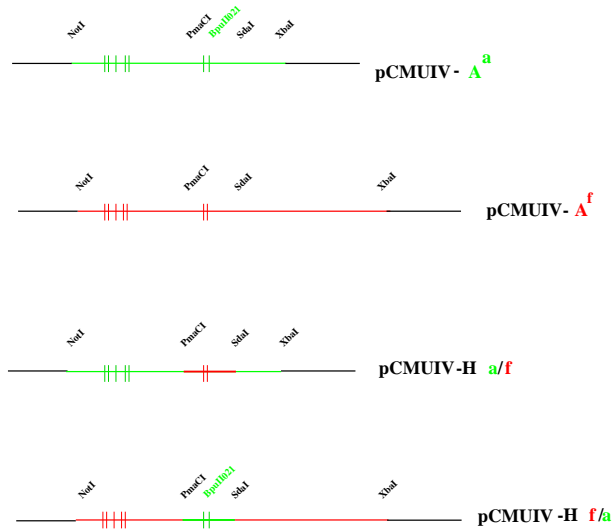


Abbildung 3.28: Klonierung der Hybridmoleküle.

Das A^a -Insert ist grün, das A^f -Insert rot dargestellt. Die A^f von A^a -unterscheidenden AS sind als vertikale Striche angedeutet, die schneidenden Restriktionsenzyme sind schräg angegeben. In den Hybridmolekülen Ha/f und Hf/a ist die reziprok ausgetauschte „Region II“ durch eine stärkere Linie hervorgehoben.

Konstrukt	A^a	A^f	Hybrid-f/a	Hybrid-a/f
<i>BpuII021</i>	+	-	+	-
<i>XbaI/NotI</i> - Verdau (in kb)	1,1	1,6	1,6	1,1

Tabelle 3.6: Unterscheidung der zwei Ausgangsmoleküle und der zwei neu generierten Konstrukte aufgrund ihrer Längen nach einem *XbaI/NotI*-Verdau und aufgrund ihrer Zugänglichkeit gegenüber *BpuII021*.

aber des A^f -Moleküls (s.a. Abb. 3.28).

So sind alle vier möglichen Varianten, die zwei Ursprungsvektoren und die zwei neu generierten Konstrukte, eindeutig zu unterscheiden (Tab. 3.6).

Mit diesen Hybriden könnte die Überselektion auf eine der beiden Regionen, die A^a von A^f unterscheiden, kartiert werden.

3.6.3 Serologische Charakterisierung der Hybridmoleküle.

Die so erhaltenen Konstrukte wurden mittels CaCl_2 -Transfektion zusammen mit dem Vektor pSVneo, der eine G418-Resistenz vermittelt, in L-Zellen exprimiert. Die P815-rCD80-Maus-Mastzellen konnten mit dem Hybrid-f/a nach Umklonie-

rung in einen retroviralen Vektor infiziert werden (s.a. Kap. 3.2.3). Das Hybrid-a/f wurde durch Elektroporation zusammen mit einem Vektor, der eine Zeozin-Resistenz vermittelt (pEGZ/HCS), in die Maus-Mastzellen eingebracht.

Mit den Alloantikörpern, die schon im ersten Teil dieser Arbeit verwendet worden waren, wurden anschließend die Expression überprüft und die neuen Konstrukte charakterisiert (Tab. 3.7). So konnten die Epitope dreier Antikörper, die nur entweder A^a- oder A^f-Transfektanten binden, mittels dieser Konstrukte eingegrenzt werden:

5F3A erkannte A^f und H-a/f, hat sein Epitop also innerhalb von „Region II“. 31/13 und 6/30/6 haben ihr Epitop außerhalb von „Region II“, da sie A^a und H-a/f erkannten. Da sich A^a und A^f extrazellulär nur in sieben Aminosäuren unterscheiden, die auf die beiden Regionen begrenzt bleiben, ist es wahrscheinlich, daß die beiden letzteren Alloantikörper an „Region I“ binden.

3.6.4 Differentielle Erkennung der Hybridmoleküle durch f-reaktive T-Zellen.

Zur näheren Charakterisierung wurden auch die Hybridkonstrukte auf Erkennung durch f-reaktive Effektoren im Zytotoxizitätsassay getestet. Die LEW-Effektoren wurden durch Stimulation mit LEW.1F-Zellen generiert. Die spezifische Erkennung von transfizierten L-Zellen durch diese Effektoren wurde in einem Zytotoxizitätstest ausgelesen.

L-Zellen, die das Hybrid-f/a exprimieren – A^f an „Region I“, A^a an „Region II“ – wurden praktisch genauso gut erkannt wie A^f-transfizierte L-Zellen. Hybrid-a/f-transfizierte L-Zellen dagegen wurden nahezu genauso wenig lysiert wie A^a- oder nicht transfizierte L-Zellen (siehe Abb. 3.29).

Durch RT1^f-Allostimulation generierte CTLs unterscheiden also zwischen beiden MHC-Regionen: nur „Region I“ von A^f wird wiedererkannt. Das ist die Region, zu der mehr TCR-Kontakte beschrieben sind (25 statt 5 wie zu „Region II“; Tab. 3.5) und deren spezifische Aminosäurekombination in den insgesamt vierzehn analysierten Ratte-MHC-I-Sequenzen einmalig ist.

3.6.5 Die Interaktion von Vα8.2-CD8-T-Zellen mit den Hybridmolekülen.

Nun sollte die Kartierung der präferentiellen Expansion Vα8.2-positiver CD8-T-Zellen in der Alloreaktion auf die zwei Regionen erfolgen, die A^f, das überselektierende Molekül, von A^a unterscheiden, dem Molekül, das keine Überselektion zu veranlassen vermag. Dafür wurden die Maus-Mastzellen P815-rCD80 verwendet, da sie sich – wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hatten – als

mAk	LEW.1F	DAxLEW.1A	L-	L-f	L-a	L-Ha/f	L-Hf/a	P815-rCD80	P815-rCD80-f	P815-rCD80-a	P815-rCD80-Ha/f	P815-rCD80-Hf/a
* F16.4.4	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
* Ox18	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# JY1/75	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# JY1/232	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# R2/15S	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# GN3/2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# MAC-30	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# JY1/132	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# JY3/50	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# YR1/146	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
# 5F3A	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
# YR2/69	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6/30/6	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
31/13	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
RIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L180/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.7: Färbung von Ratte-Lymphknotenzellen und von Hybrid-transfizierten Zelllinien mit monoklonalen Alloantikörpern.

*: dieser Antikörper erkennt Ratte-MHC-I-Moleküle unabhängig vom Haplotyp.

diese Antikörper sind f-Haplotyp-spezifisch.

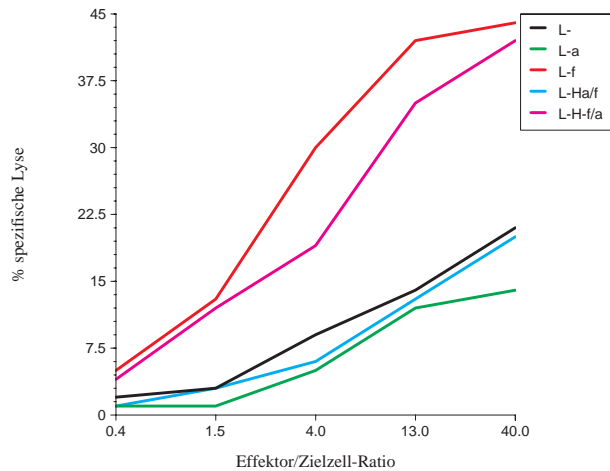


Abbildung 3.29: Erkennung der Kl. I-Hybrid-transfizierten L-Zellen durch LEW.1F-aktivierte LEW-Effektoren. Restimulation und Blockade.

Stimulatoren für eine MLR am besten eignen.

Zunächst wurde mittels FACS-Analyse überprüft, ob die Expression des kostimulatorischen Moleküls rCD80 (CD80 der Ratte) und von Ratte-MHC Kl. I in den Klonen vergleichbar ist.

Wie aus Abb. 3.30 entnommen werden kann, wird CD80 in allen Klonen gleich stark exprimiert. Jedoch ist die Expression des Hybrid-a/f-Moleküls höher als die der anderen MHC-Moleküle. Der Grund dafür ist, daß das Hybrid-a/f über Transfektion in die Zelllinie eingebracht wurde und nicht durch Infektion.

Mit diesen Klonen wurde anschließend eine MLR durchgeführt. Dafür wurden LEW-LN-Zellen mit den Ratte-Kl. I-exprimierenden P815-rCD80-Zellen stimuliert. Nach fünf Tagen wurde durch FACS-Analyse der Prozentsatz der $V\alpha 8.2$ -positiven CD8-T-Zellen in den kleinen unstimulierten Zellen – im Vergleich mit dem in den großen alloreaktiven Blasten – untersucht.

Wie in Abb. 3.31 zu erkennen ist, stimulierten Maus-Mastzellen, die kein Ratte-MHC Kl. I-Molekül exprimierten, und A^a -exprimierende Mausmastzellen, sogar eine geringere Expansion AV8S2-positiver als AV8S2-negativer CD8-T-Zellen. Nur circa 1 % der Blasten exprimiert nach A^a -Stimulation AV8S2, vor Stimulation jedoch circa 2 % der CD8-T-Zellen (vgl. Abb. 3.32). Die durch A^f -vermittelte Expansion der AV8S2-CD8-Zellen war nahezu genauso hoch wie die durch die Positivkontrolle (LEW.1F *ex vivo*) bewirkte. H-f/a- und H-a/f-exprimierende P815-rCD80-Klone provozierten eine $V\alpha 8.2^+$ -CD8-Zell-Expansion, die zwischen der von A^f und der von A^a hervorgerufenen lag. Die von den Hybriden verursachte Expansion unterschied sich damit nicht.

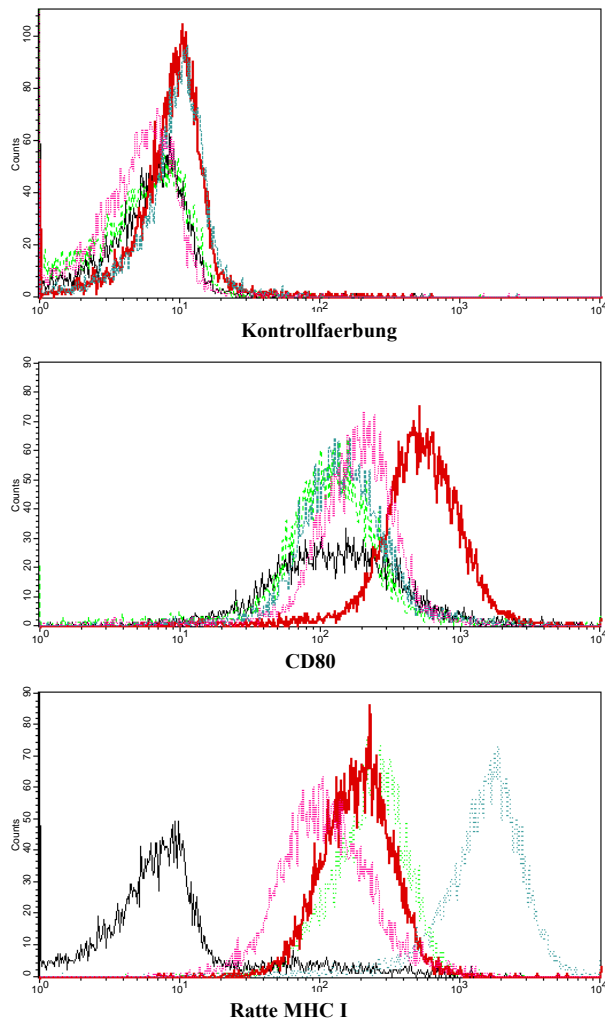


Abbildung 3.30: Färbung der Ratte MHC Kl. I-infizierten P815-rCD80-Klone mit dem Isotypkontrollantikörper.

Untransfizierte P815-rCD80-Zellen sind als schwarze dünne Linie gezeigt, der A^a -infizierte P815-rCD80-Klon ist als grüne unterbrochene Linie gezeigt, der A^f -infizierte als dicke rote Linie, ein Hybrid-a/f-infizierter als türkise schwach gepunktete Linie, ein Hybrid-f/a-infizierter als pinkfarbene unterbrochene Linie.

Obwohl im Zytotoxizitätstest mit f-reaktiven CD8-T-Zellen überwiegend „Region I“ erkannt wurde, hatten nun in diesem Assay, der Beobachtung der Expansion AV8S2-positiver CD8-Zellen im Vergleich mit AV8S2-negativen, beide MHC-Regionen einen äquivalenten Einfluß auf die AV8S2-Zell-Expansion. Für die Erkennung durch CD8-T-Zellen insgesamt ist also „Region I“ wichtiger als „Region II“, wobei für AV8S2-positiv CD8-T-Zellen beide Regionen einen Beitrag leisten. Entsprechend sind für „Region I“ viel mehr TCR-Kontakte beschrieben als für „Region II“ (25 gegenüber 5, das erklärt die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests), wohingegen die beschriebenen CDR1α- und CDR2α-Kontakte – und nur CDR1α und CDR2α sind AV8S2-codiert – für beide Regionen nahezu gleich sind (4 gegenüber 5, das erklärt die MLR-Daten; Tab. 3.5).

Für die präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen also leisten beide Regionen die A^f, das überselektierende Molekül, von A^a unterscheiden, einen Beitrag. Eine weitere Analyse des Einflusses einzelner Aminosäuren auf die AV8S2-Zell-Expansion durch die Einführung von Punktmutationen schien damit nicht vielversprechend und wurde nicht unternommen.

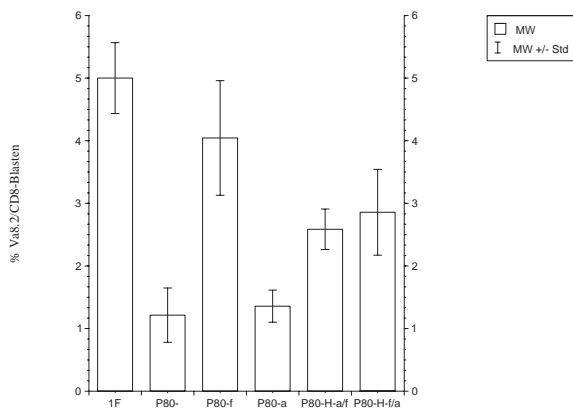


Abbildung 3.31: Kartierung der Regionen des MHC Kl. I-Moleküls, die für die Überselektion von V α 8.2-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion wichtig sind (P7). MLR von LEW-LN-T-Zellen gegen die Ratte Kl. I-transfizierten P815-rCD80-Zellen (P80). Nur die Blasten sind gezeigt.

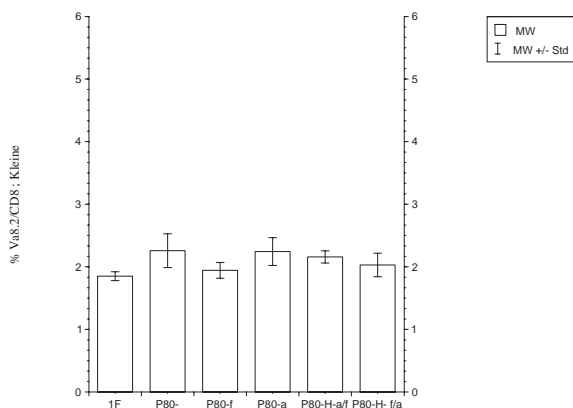


Abbildung 3.32: Kartierung der Regionen des MHC Kl. I-Moleküls, die für die Überselektion von V α 8.2-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion wichtig sind (P7). MLR von LEW-LN-Zellen gegen die Ratte Kl. I-transfizierten P815-rCD80-Zellen (abgekürzt, P80), die kleinen Zellen sind gezeigt.

Kapitel 4

Diskussion

MHC-Moleküle interagieren mit T-Zellen. In der thymischen Selektion führt die TCR/MHC-Interaktion zur Herausbildung des Repertoires reifer T-Zellen, in der Peripherie ist die MHC-Interaktion notwendig, damit die T-Zellen antigene Peptide erkennen können und bei der künstlich herbeigeführten Interaktion in einer Transplantation (oder MLR) wirken MHC-Moleküle als starke Alloantigene für T-Zellen und induzieren die Transplantatabstoßung.

In unserer Arbeitsgruppe war eine besondere Interaktion eines TCR-V-Segments mit einem MHC beobachtet worden: RT1^f, der MHC der LEW.1F-Ratte, stimuliert bevorzugt die Expansion TCR-V α 8.2-Segment-positiver im Vergleich zu AV8S2-negativen CD8-T-Zellen. Dieses Phänomen konnte sowohl in der thymischen Selektion als auch bei der Alloerkennung in einer MLR beobachtet werden (TORRES-NAGEL et al. 1994): 14 % der reifen CD8-T-Zellen der LEW.1F-Ratte sind AV8S2-positiv im Vergleich zu nur 1-2 % der CD8-Zellen bei thymischer Selektion durch andere MHC-Haplotypen. Eine dreifach bevorzugte Expansion AV8S2-positiver im Vergleich mit AV8S2-negativen CD8-T-Zellen ließ sich aber auch bei einer RT1^f-Allostimulierung beobachten (TORRES-NAGEL et al. 1994). Es handelt sich dabei um die stärkste bis jetzt gefundene Überselektion eines TCR-Segments durch einen MHC-Haplotyp.

Auslöser dieses Phänomens ist vermutlich ein polymorphes MHC Kl. Ia-Protein der LEW.1F-Ratte, da die präferentielle Expansion von AV8S2-Zellen nur im CD8-T-Zell-Kompartiment auftritt und CD8-T-Zellen mit MHC Kl. Ia-Proteinen interagieren.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, das MHC-I-Molekül der LEW.1F-Ratte zu identifizieren, das diese präferentielle Expansion verursacht. Zusätzlich sollten die Kontaktpunkte der Interaktion zwischen dem TCR-AV8S2-Segment und dem MHC-Molekül kartiert werden.

RT1.A^f, ein polymorphes MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte, konnte in dieser Arbeit isoliert und charakterisiert werden. Auch ein zweites MHC Kl. I-

Molekül aus der LEW.1F-Ratte, RT1.A2^f, das von einer Gruppe aus Babraham isoliert und uns zur Verfügung gestellt wurde (JOLY et al. 1998), wurde in die Charakterisierung miteinbezogen. Weiterhin gelang es zu zeigen, daß A^f die präferentielle Interaktion mit AV8S2-positiven CD8-T-Zellen in der Alloreaktion vermittelt, und die Kontaktpunkte der A^f/AV8S2-Interaktion konnten partiell kartiert werden.

Die dabei gewonnenen Ergebnisse sollen im folgenden diskutiert werden, wobei zunächst auf die Charakterisierung der aus der LEW.1F-Ratte klonierten MHC-Moleküle näher eingegangen wird (Abschn. 4.1), danach auf die Fähigkeit des A^f-Moleküls, eine präferentielle Expansion AV8S2-verwendender CD8-T-Zellen zu stimulieren (Abschn. 4.2) und schließlich auf die Kartierung der Kontaktpunkte zwischen AV8S2 und A^f (Abschn. 4.3). Zuletzt soll der Beitrag der MHC-gebundenen Peptide an dieser Interaktion besprochen werden (Abschn. 4.4).

4.1 Charakterisierung der klonierten MHC Kl. I-Moleküle der LEW.1F-Ratte.

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Isolierung des MHC Kl. I-Moleküls der LEW.1F-Ratte, das die präferentielle Expansion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen vermittelt. Dafür war der Ansatz der RT-PCR-Klonierung mit einem Oligonukleotidpaar gewählt worden, das bereits zur Isolierung klassischer MHC Kl. I-Moleküle der Ratte verwendet worden war (WANG et al. 1996).

Bei der Klonierung über RT-PCR werden auch MHC-Moleküle amplifiziert, die nicht mit typischen¹ T-Zellen interagieren. Solche Moleküle können keine präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen verursachen. Grund für die Isolierung auch nicht „erwünschter“ Moleküle ist die Vielzahl sehr ähnlicher Gene im MHC. Neben den klassischen MHC-Ia-Genen – und nur diese verursachen die TC-Restriktion – gibt es auch eine große Anzahl von MHC-Ib-Genen² und Pseudogenen. Klone, die durch RT-PCR isoliert wurden, müssen daher daraufhin überprüft werden, ob sie überhaupt funktionell sind, also TC-Restriktionselemente darstellen.

Ein erster Ansatz zur genaueren Untersuchung der durch RT-PCR-erhaltenen Klone ist ein Vergleich ihrer **DNA-Sequenz** mit anderen Ratte-MHC Kl. Ia-Sequenzen. Die meisten Ib-Gene lassen sich schon aufgrund ihrer Sequenz von

¹Ausnahmen sind z.B. die $\gamma\delta$ T-Zellen, für die eine Interaktion mit den MHC Ib-Molekülen MICA und MICB beschrieben wurde oder NK-T-Zellen, die mit dem nicht MHC-codierten MHC-I-artigen CD1-Molekül interagieren.

²MHC-Ib-Gene werden meist schwächer und gewebsspezifischer exprimiert, üben nur teils immunrelevante Funktionen aus und sind weniger polymorph als MHC-Ia-Gene (WILSON und P.J. 1998; BRAUD et al. 1999).

Ia-Genen unterscheiden. Da die Funktionalität eines isolierten Gens so allerdings nicht demonstriert werden kann, müssen noch weitere Kriterien zur Auswahl geeigneter Gene herangezogen werden.

Als zweite Test-Möglichkeit kann ein **serologischer Ansatz** gewählt werden: Monoklonale Antikörper (in Folge Alloantikörper genannt), die durch die Immunisierung von Ratten eines MHC-Haplotyps mit Zellen eines anderen Haplotyps³ generiert wurden, erkennen (hauptsächlich) MHC-Ia-Proteine⁴ des fremden Haplotyps, nicht aber die des eigenen. Häufig reagieren diese Alloantikörper auch mit den MHC-Ia-Proteinen von Ratten wieder anderer Haplotypen (Kreuzreaktivität). Über RT-PCR isolierte MHC-Ia-Gene der LEW.1F-Ratte müssen die Alloantikörperreaktivität der LEW.1F-Ratte abdecken können.

Eine dritte Überprüfung der über RT-PCR aus der LEW.1F-Ratte isolierten Gene, die sogar deren Erkennung durch alloreaktive CTLs zeigt, ermöglicht ein **Zytotoxizitätstest** mit LEW.1F-aktivierten LEW-CD8-T-Zellen: Funktionelle Ia-Gene der LEW.1F-Ratte — im Gegensatz zu Ib-Genen oder schwach exprimierten Ia-Genen — induzieren in einer MLC⁵ eine starke Alloreaktion und führen zur Entstehung von CTLs. Diese sind sehr spezifisch und erkennen genau die MHC-Proteine, die ihre Differenzierung induzierten. Erkennen derartige CTLs nun die RT-PCR-klonierten Gene, ist das ein starker Hinweis darauf, daß es sich um funktionelle Ia-Gene handelt. Erkennen sie die klonierten Gene nicht, zeigt das, daß die Gene keine Alloerkennung induzierten, weil sie nur schwach exprimiert oder keine MHC-Ia-Proteine sind. Über RT-PCR klonierte Gene, die in einem solchen Zytotoxizitätstest nicht erkannt werden, sind folglich für diese Arbeit nicht relevant.

Werden alle drei Kriterien (Sequenz, Serologie, Zytotoxizitätstest) zur Untersuchung der Funktionalität von MHC-Molekülen erfüllt, dann zeigt das sicher, daß die klonierten Gene funktionelle MHC Kl. Ia-Proteine sind, also T-Zellen tatsächlich Antigen präsentieren und daher als Kandidaten für die Stimulation einer präferentiellen Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen in Frage kommen.

Die beiden über RT-PCR aus der LEW.1F-Ratte isolierten Moleküle A^f und A2^f wurden allen diesen Untersuchungen unterzogen: Aufgrund ihrer **DNA-Sequenzen** können beide als Ia-Gene charakterisiert werden (Abb. 3.10, S. 69) und

³Am besten sollten dafür congenetische Rattenstämme verwendet werden, da sich diese ausschließlich im MHC unterscheiden.

⁴MHC Kl. II-Proteine spielen hier keine Rolle, da sie nur von Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden.

⁵Eine MLC ist eine MLR (gemischte Lymphozytenreaktion) zur Generierung von CTLs. Inaktivierte Zellen eines Haplotyps (die Stimulatoren) werden mit Zellen eines anderen Haplotyps (den „Respondern“) gemischt. Diejenigen Responderzellen, die den fremden Haplotyp erkennen, also alloreaktiv sind, reagieren zunächst mit blastoider Vergrößerung und Proliferation und differenzieren sich schließlich zu Effektoren, den CTLs.

aufgrund dieser wurden sie auch als solche beschrieben (JOLY et al. 1998).

Beim Test der **serologischen Merkmale** der klonierten Moleküle war auffällig, daß die gesamte Alloantikörperreaktivität der LEW.1F-Ratte schon durch das A^f -Molekül alleine abgedeckt wird: Von den neunzehn getesteten Alloantikörpern waren alle A^f -reaktiv; $A2^f$ ist zur Erklärung des LEW.1F-Phänotyps überflüssig. Es wird sogar nur durch vier von zehn getesteten Alloantikörpern erkannt⁶ (Tab. 3.1, S. 71). Diese ungleiche Aufteilung der Alloantikörperreaktivität unter zwei Ia-Molekülen eines Haplotyps ist ungewöhnlich: Für die zwei MHC-Ia-Moleküle der PVG-RT6-Ratte ($RT1^c$) z.B. wurde beschrieben, daß sechs von zwanzig getesteten Alloantikörpern $A1^c$ erkennen, sieben $A2^c$ und sieben beide Moleküle (JOLY et al. 1996).

Allerdings wurden die meisten in Tabelle 3.1, S. 71, aufgeführten LEW.1F-kreuzreaktiven Alloantikörper durch Immunisierung mit a-Haplotyp-Zellen generiert (s. Abschn. 2.1.1.3, S. 39 f). Da sich A^f und A^a extrazellulär nur in sieben Aminosäuren unterscheiden, ist also auch eine hohe Kreuzreaktivität A^a -reaktiver Alloantikörper mit A^f zu erwarten. So zeigt Tabelle 4.1, S. 109, daß von 57 durch Immunisierung mit dem a-Haplotyp generierten Antikörpern (im folgenden a-Alloantikörper genannt) 44 auch $RT1^{f7}$ -reaktiv sind, aber nur 12 $RT1^l$ binden. Mit $RT1^c$ und $RT1^g$ wiederum sind fünf von 56 bzw. nur einer aus 39 getesteten, durch a-Immunisierung generierten Alloantikörper kreuzreaktiv.

Für $RT1^f$ ist die Kreuzreaktivität mit a-Alloantikörpern also viel höher als für die meisten anderen Haplotypen. Die einzige Ausnahme ist $RT1^d$, seine a-Alloantikörperkreuzreaktivität gleicht derjenigen von $RT1^f$: 56 der a-Alloantikörper wurden auch für $RT1^d$ getestet und 44 der 56 reagieren mit $RT1^d$ (Tab. 4.1, S. 109). Allerdings ist (sind) die A^d -Sequenz(en) nicht bekannt, so daß nicht überprüft werden kann, ob die A^d -Sequenz A^a ebenso nahe verwandt ist wie die A^f -Sequenz. $RT1^d$ zumindest stimuliert – wie A^a – keine Überselektion von AV8S2-CD8-T-Zellen (TORRES-NAGEL et al. 1994).

Alloantikörper, die durch a-Immunisierung generiert wurden, weisen also eine hohe Kreuzreaktivität mit $RT1^f$ auf, die vermutlich durch die große Ähnlichkeit von A^f und A^a verursacht ist. Das kann erklären, daß alle durch a-Immunisierung generierten LEW.1F-reaktiven in dieser Arbeit getesteten Antikörper auch A^f , aber nicht unbedingt $A2^f$ erkennen. Insgesamt zeigen die serologischen Daten deutlich, daß A^f ein stark exprimiertes, durch Alloantikörper gut erkanntes, funktionelles MHC-Ia-Molekül ist. Für $A2^f$ wurde das damit zwar nicht nachgewiesen, aber das ist – wie eben dargelegt – kein Grund zu vermuten, daß es für die T-Zell-Alloerkennung unbedeutend ist.

Bei der Überprüfung der Funktionalität beider Moleküle durch einen **Zytoto-**

⁶Für das Testen von $A2^f$ standen nur noch zehn Alloantikörper zur Verfügung.

⁷ $RT1^f$ setzt sich aus A^f und $A2^f$ zusammen!

Haplotyp	RT1 ^c	RT1 ^d	RT1 ^f	RT1 ^g	RT1 ^l
kreuzreaktive Alloantikörper/insgesamt	5/56	44/56	41/57	1/39	12/57

Tabelle 4.1: Kreuzreaktivität von Alloantikörpern, die durch RT1^a-Immunisierung generiert wurden, mit anderen Haplotypen (BUTCHER 1987). a-Alloantikörper haben eine hohe Kreuzreaktivität mit RT1^f und RT1^d und eine geringe mit RT1^g, RT1^c und RT1^l.

In der zweiten Zeile der Tabelle gibt die Zahl nach dem „/“ die Anzahl der a-Alloantikörper an, die für den jeweiligen Haplotyp getestet wurden. Die Zahl vor dem „/“ zeigt an, wieviele davon mit dem jeweiligen Haplotyp kreuzreaktiv sind.

xizitätstest mit LEW-CTLs, die durch LEW.1F-Allostimulierung generiert worden waren (I-anti-f-CTLs), fiel auf, daß A^f gut erkannt wurde, A2^f aber nur schlecht (Abb. 3.14, S. 74 und 3.17, S. 76). Eine schlechte Erkennung durch so generierte CTLs ist für MHC-Ia-Moleküle ungewöhnlich, da sie u.a. durch die Provokation einer starken Alloreaktion und damit auch durch die Generierung von Allo-CTLs definiert sind. Auch wurde eine Erkennung durch Allo-T-Zellen sowohl für das A2^c-Gen als auch für das A1^c-Gen der PVG-RT6-Ratte in einem Zytotoxizitätstest beschrieben (JOLY et al. 1996). Mit diesem Test wurde gezeigt, daß es sich bei dem A^f-Molekül um ein funktionelles MHC Kl. Ia-Gen handelt, für das A2^f-Molekül hingegen wurde das noch nicht bewiesen.

Die Erkennung der aus der LEW.1F-Ratte isolierten Moleküle durch RT1^f-reaktive CTLs ist der wichtigste Hinweis auf die Funktionalität der klonierten Moleküle. Die Erkennung bleibt aus, wenn in der MLC keine allo-CTLs induziert wurden, weil die zu testenden Moleküle z.B. *in vivo* nur schwach exprimiert oder keine Ia-Moleküle sind. Daher sollte überprüft werden, ob das „Übersehen“ von A2^f durch RT1^f-reaktive CTLs eventuell auch noch anders erklärt werden könnte. Dazu wird zunächst verglichen, ob eine hohe Ähnlichkeit von A2^f mit A^l dem Effektor-MHC-I-Molekül besteht, die die A2^f-Erkennung durch RT1^l-Effektoren verhindern würde. Danach wird erörtert, ob eine veränderte TAP-Beladung und dadurch Alloerkennung A2^f unerkannt bleiben läßt.

Die ausbleibende Lyse A2^f-exprimierender Zielzellen durch I-anti-f-CTLs wäre verständlich, wenn RT1.A^l, das MHC Kl. Ia-Molekül des LEW-Effektorstammes⁸, dem A2^f-Molekül sehr ähnlich ist: Im Laufe der negativen thymischen Selektion werden selbstreaktive Zellen eliminiert. Bei einer großen Übereinstimmung der beiden Moleküle wären die meisten A^l-reaktiven Zellen auch A2^f-reaktiv und in den thymischen Selektionsprozessen der LEW-Ratte bereits eliminiert worden.

⁸Das ist einer der Rattenhaplotypen, in dem trotz ausführlicher Suche kein zweites MHC-Ia-Gen gefunden werden konnte.

Daher bietet es sich an, die Ähnlichkeit der beteiligten MHC-Moleküle – A^l , $A2^f$ und A^f – zu überprüfen. Schon ein globaler Vergleich der Nukleotidsequenzen der drei Moleküle mit anderen Ratte-MHC-Ia-Sequenzen zeigt, daß A^l und A^f in einer Gruppe liegen, $A2^f$ aber in einer anderen (Abb. 3.10, S. 69), spricht also gegen eine hohe Ähnlichkeit von $A2^f$ mit A^l .

Wichtiger aber ist es, die für die TCR-Kontaktierung relevanten Aminosäuren zu betrachten. Das sind v.a. die direkt TCR-kontaktierten MHC-Positionen aber auch die MHC-Positionen, die indirekt die TCR-Erkennung beeinflussen, da sie das Spektrum MHC-gebundener Peptide ändern.⁹

Nach Garboczi et al. 1996, Garcia et al. 1998 und Ding et al. 1998 gibt es zwanzig direkt TCR-kontaktierte MHC-Positionen (Tab. 4.2, S. 111). A^f und $A2^f$ unterscheiden sich nun nicht nur beide in jeweils genauso vielen TCR-kontaktierten Aminosäuren von A^l (fünf), sondern vier dieser fünf Unterschiede liegen sogar an denselben MHC-Positionen (Tab. 4.2, S. 111). Folglich ist $A2^f$ A^l in den direkt TCR-kontaktierten Aminosäuren nicht besonders ähnlich.

Nun zu einem Vergleich der MHC-Positionen der drei Moleküle, die das Spektrum bindender Peptide beeinflussen und die TCR-Erkennung dadurch indirekt manipulieren können. Die Peptidmotive werden hauptsächlich durch die B- und die F-Tasche der MHC-Moleküle bestimmt. In Tabelle 4.3, S. 112 (1.) sind die Aminosäuren der drei MHC-Moleküle aufgelistet, die als Komponenten der B- und der F-Taschen gelten (MATSUMURA et al. 1992; JOLY et al. 1998).

Sowohl A^f als auch $A2^f$ unterscheiden sich in der B-Tasche durch mehrere Aminosäuren von A^l . Dadurch kommt es in A^f und $A2^f$ zu einer Veränderung der B-Taschen-Ladung bzw. -Ladungsverteilung im Vergleich zur A^l -B-Taschen-Ladung. Die Peptidbindungseigenschaften sowohl der A^f - als auch der $A2^f$ -B-Tasche unterscheiden sich demnach voraussichtlich deutlich von derjenigen der A^l -B-Tasche.

In der F-Tasche gibt es jeweils zwei Aminosäureabweichungen in A^f und $A2^f$ im Vergleich zu A^l . Diese Änderungen führen zu einer Erhöhung der negativen Ladung der F-Tasche. Damit unterscheiden sich A^f und $A2^f$ auch in den Peptidbindungsanforderungen der F-Tasche deutlich von A^l .

Der Vergleich der MHC-Taschen, die das Spektrum MHC-bindender Peptide bestimmen, zeigt, daß voraussichtlich sowohl A^f als auch $A2^f$ andere Peptide binden als A^l . Also auch indirekt – über das Spektrum MHC-gebundener Peptide – unterscheiden sich $A2^f$ und A^l deutlich für CTLs.

$A2^f$ wird folglich auf keinen Fall ausschließlich von T-Zellen gut erkannt, die auch A^l stark erkennen und die daher in der negativen thymischen Selektion der LEW-Ratte bereits eliminiert worden sind. Damit ist es unwahrscheinlich, daß

⁹Insgesamt überwiegt die direkte MHC-Erkennung durch den TCR mit 83 von 145 beschriebenen TCR-Kontakten (vgl. Tab. 4.4, S. 124).

TCR-kontaktierte MHC-Positionen	A^l	A^f	$A2^f$	Abweichendes Molekül
58	D	E	E	A^l
59	Y	Y	Y	
62	R	R	R	
65	Q	Q	Q	
69	G	G	E	$A2^f$, ein Kontakt zu CDR3 α (A6 und B7)
72	Q	Q	Q	
73	N	I	I	A^l
76	V	V	V	
79	R	R	R	
149	R	A	Q	$A2^f$ und A^f
150	R	A	T	$A2^f$ und A^f
154	E	E	E	
155	R	R	R	
158	A	A	A	
159	Y	Y	Y	
162	G	G	G	
163	T	T	T	
166	E	E	E	
167	W	S	W	A^f , vier Kontakte zu CDR1 α (B7), ein Kontakt zu CDR1 α (A6)
170	R	R	R	

Tabelle 4.2: Tabelle der — nach Garboczi et al. 1996, Garcia et al. 1998 und Ding et al. 1998 — TCR-kontaktierten MHC-Positionen. A^f und $A2^f$ unterscheiden sich von A^l gleich stark.

Die Aminosäuren von A^f bzw. $A2^f$, die sich gegenüber A^l unterscheiden, sind rot gedruckt.

B-Tasche	A ^l	Y	D ⁽⁻⁾	S	V	Y	E ⁽⁻⁾	A	N	Y	
	A ^f	Y	Y	A	V	M	E ⁽⁻⁾	A	H ⁽⁺⁾	Y	
	A2 ^f	Y	Y	E ⁽⁻⁾	V	Y	E ⁽⁻⁾	A	G	Y	
	Pos.	7	9	24	34	45	63	67	70	99	
F-Tasche	A ^l	S	L	I	R ⁽⁺⁾	D ⁽⁻⁾	Y	Y	I	T	W
	A ^f	D ⁽⁻⁾	L	I	E ⁽⁻⁾	D ⁽⁻⁾	Y	Y	I	T	W
	A2 ^f	D ⁽⁻⁾	L	I	V	D ⁽⁻⁾	Y	Y	I	T	W
	A ^a	D ⁽⁻⁾	L	I	E ⁽⁻⁾	D ⁽⁻⁾	Y	Y	I	T	W
	Pos.	77	81	95	97	116	118	123	124	143	147

Tabelle 4.3: Tabelle der MHC-Positionen, die — nach Matsumura et al. 1992 und Joly et al. 1998 — zu den B- und F-Taschen beitragen.

- 1.) Sowohl A^f als auch A2^f unterscheiden sich in beiden für das Peptidspektrum relevanten Taschen stark von A^l.
- 2.) Die F-Taschen von A^a und A^f stimmen völlig überein. A2^f aber weicht sogar in einer TAP-relevanten (rot markierten) F-Taschen-Aminosäuren ab (JOLY et al. 1998).

Die geklammerten Zeichen geben die Ladung der jeweiligen AS an, fett gedruckt sind AS-Positionen, die in A^l, A^f und A2^f nicht übereinstimmen, rot markiert sind AS, die den TAP-abhängigen Dimorphismus beeinflussen.

der Effektor-MHC (RT1^l) aufgrund seines Einflusses auf das Repertoire reifer T-Zellen die A2^f-Erkennung verhindert.

Diese Hypothese kann auch experimentell durch die Verwendung eines weiteren Effektorhaplotyps überprüft werden.

Eine andere Erklärung für die ausbleibende Erkennung von A2^f durch RT1^f-reaktive CTLs wäre eine schlechte Peptid-Versorgung von A2^f nicht aber von A^f durch das Maus-TAP der „Wirtszellen“¹⁰: TAP heißt der Peptidtransporter, der zytosolische Peptide in das ER transportiert, so daß MHC-Moleküle damit beladen werden können (vgl. Abschn. 1.2.3, S. 18). Das Maus-TAP — im Gegensatz zum Ratte-TAP-A-Allel — ist nicht fähig, Ratte-MHC-Moleküle mit sehr saurer F-Tasche wie A^a mit den optimalen Peptiden (positiver C-Terminus) zu beladen (JOLY et al. 1994). Das führt bei der Koexpression eines MHC-Moleküls mit saurer F-Tasche (z.B. A^a) zusammen mit dem Maus-TAP zur Beladung des MHC-Moleküls mit einem veränderten Peptidspektrum und das wiederum ermöglicht alloreaktiven CTLs, zwischen MHC-Molekülen im TAPA- bzw. im TAPB-Kontext zu unterscheiden (LIVINGSTONE et al. 1991; THORPE et al. 1995; POWIS et al. 1996). Es gibt also CTLs, die ein bestimmtes MHC-Molekül nur bei Koexpression

¹⁰In diesem Fall wurden sowohl L-Zellen (Maus) als auch Maus-Mastzellen als „Wirtszellen“ verwendet (Abb. 3.14, S. 74 und 3.17, S. 76).

mit einem TAP-Allel erkennen, nicht aber bei Koexpression mit dem anderen. Das aus dem Blickwinkel der T-Zelle unterschiedliche Aussehen der MHC-Moleküle mit saurer F-Tasche bei Koexpression verschiedener TAP-Varianten wird im folgenden als „TAP-abhängiger Dimorphismus“ bezeichnet.

Die CTL-Alloerkennung im hier verwendeten Testsystem könnte ebenfalls TAP-Allel beeinflusst sein: Die CTLs wären durch Ratte-TAPA-Allel-assoziiertes $A^f/A2^f$ in der MLC aktiviert worden, sollten nun aber durch Maus-TAP beladenes $A^f/A2^f$ erkennen. Wenn $A2^f$ aber nicht A^f durch Maus-TAP mit anderen Peptiden beladen würde, als in der Ratte durch deren TAP-A-Allel, würde zwar $A2^f$, nicht aber A^f , für LEW.1F-reaktive CTLs verändert aussehen und diese könnten $A2^f$ daher nicht erkennen.

Die F-Tasche, deren AS-Kombination den TAP-bedingten Dimorphismus auslösen kann, stimmt in A^a – dem Molekül durch das der funktionelle TAP-Allelismus entdeckt und für das er beschrieben wurde – und A^f absolut überein (Tab. 4.3, S. 112, 2.). A^f also zeigt sehr wahrscheinlich den TAP-abhängigen Dimorphismus.

Die $A2^f$ -F-Tasche weicht dagegen leicht von der für A^a beschriebenen ab. Wie der Tabelle 4.3 entnommen werden kann, ist von den drei für den TAP-bedingten Dimorphismus wichtigen sauren F-Taschen-Aminosäuren in $A2^f$ eine ungeladen (D, V, D statt D, E, D). Für ein humanes MHC-Molekül mit ähnlicher AS-Komposition (HLA-B27.05: D, N, D) konnte aber gezeigt werden, daß seine Erkennung TAP-Allel beeinflussbar ist (SIMMONS et al. 1996; JOLY et al. 1998). Die $A2^f$ -Erkennung ist daher voraussichtlich ebenfalls TAP-Kontext beeinflusst, wenn auch nicht so stark wie die A^f -Erkennung. Also auch der TAP-abhängige Dimorphismus vermag nicht zu erklären, warum $A2^f$ von $RT1^f$ -reaktiven CTLs unerkant bleibt.

Die letzte Erklärungsmöglichkeit bleibt eine schwache *in vivo*-Expression von $A2^f$ in der LEW.1F-Ratte. Dann könnte es weder als TC-Restriktionselement dienen noch eine Alloreaktion in der MLC hervorrufen, $A2^f$ -reaktive CTLs würden nicht entstehen. Experimentell konnte diese Möglichkeit nicht widerlegt werden, da keine $RT1^f$ -reaktiven Antikörper gefunden wurden, die mit $A2^f$ nicht jedoch mit A^f reagieren. Da die beiden vorherigen Erklärungsversuche widerlegt werden konnten, dieser letzte jedoch nicht, erscheint es sinnvoll eine schwache $A2^f$ *in vivo*-Expression als wahrscheinlich anzunehmen.

Alle in diesem Abschnitt erörterten Fragen zeigen deutlich, daß A^f ein polymorphes, funktionelles MHC KI. Ia-Molekül der LEW.1F-Ratte sein muß. Für $A2^f$ muß aufgrund dieser Daten angenommen werden, daß es *in vivo* schwach exprimiert ist und es daher keine Alloerkennung stimuliert.

4.2 Die präferentielle Interaktion von V α 8.2-CD8-T-Zellen mit A^f in der MLR.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Molekül der LEW.1F-Ratte zu identifizieren, das die präferentielle Expansion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen in der positiven thymischen Selektion und in der Alloreaktion bewirkt (TORRES-NAGEL et al. 1994).

Die Überselektion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen ist in der positiven thymischen Selektion zwar besonders stark ausgeprägt (13 % aller reifen CD8-T-Zellen der LEW.1F-Ratte exprimieren das V α 8.2-Segment (Abb. 3.2, S. 61); die AV8S2-CD8-Zellen des LEW.1F-Rattenstammes sind damit 5-16 fach häufiger vertreten als in sieben congenen Stämmen (0,8-2,4 % der CD8-Zellen sind hier AV8S2⁺) (TORRES-NAGEL et al. 1994)), die thymische Selektion ist jedoch experimentell nur aufwendig zu überprüfen, z.B. durch die Generierung MHC-transgener Ratten.

Daher wurde für diese Arbeit das Modell der Alloerkennung gewählt. Hier ist die präferentielle Expansion zwar weniger stark ausgeprägt – 6 % aller RT1^f-reaktiven LEW-CD8-Blasten sind AV8S2⁺ im Vergleich zu circa 2 % der noch unstimulierten Zellen (Abb. 3.4, S. 63). Es findet also eine nur dreifache Expansion statt. Dreifach ist die Expansion auch beim Vergleich der f-alloreaktiven LEW-CD8-Blasten mit den a-alloreaktiven LEW-CD8-Blasten (Abb. 3.4, S. 63). Allerdings läßt sich die präferentielle Expansion in der Alloreaktion leicht testen, z.B. durch MLRs.

Die erfolgreichste Methode zur Untersuchung der präferentiellen Expansion LEW-AV8S2-positiver CD8-T-Zellen in der Alloerkennung von A^f/A2^f war die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR): A^f und A2^f wurden in „Wirtszelllinien“ (den Stimulatoren) exprimiert und damit „Responder“-T-Zellen eines MHC-congenen Stammes (RT1^f) stimuliert. Diejenigen unter den „Responder“-T-Zellen, die den fremden MHC erkennen – normalerweise ca. 1-10 % (MASON 1998) –, werden aktiviert, beginnen zu proliferieren und sind dann als große Zellen (Blasten) erkennbar. Stimuliert das eingebrachte LEW.1F-Molekül bevorzugt AV8S2-Zellen, nicht aber T-Zellen, die andere V α -Segmente benutzen, so ist der Prozentsatz an AV8S2-Zellen in den Blasten höher als in den kleinen Zellen. Außerdem ist der Prozentsatz der V α 8.2-positiven Blasten dann höher als bei Stimulation mit MHC Kl. I-Molekülen anderer Ratte-Haplotypen.

Bei der Verwendung der drei „Wirtslinien“ L-Zellen, T-Zell-Hybridom 35/1 und Maus-Mastzellen fielen zwei für das Erzielen aussagekräftiger MLRs **technisch relevante Faktoren** auf: die Art der Kostimulation und der Xeno¹¹-MHC

¹¹Xeno bedeutet im Griechischen „fremd“, in der Immunologie wird das mit „aus einer anderen Art“ gleichgesetzt. In diesem Fall sind die Stimulatorzellen, die „Wirtszellen“ für das Ratten-Gen

der „Wirtszelllinie“.

Die **Kostimulation** liefert naiven T-Zellen das sogenannte „zweite Signal“, das neben dem primären, dem TCR-Signal, von ihnen empfangen werden muß, damit sie aktiviert werden und proliferieren. Da auch in den MLRs naive T-Zellen aktiviert werden, ist eine Kostimulation hier ebenfalls unerlässlich (RATTIS et al. 1998; CHAPEROT et al. 1999; IEZZI et al. 1998). *In vivo* erfolgt die Kostimulation hauptsächlich über die CD80- bzw. CD86-Interaktion auf der APC mit CD28 auf der T-Zelle. Sie führt dann u.a. zu verstärkter IL-2-Transkription und zur Stabilisierung der IL-2-mRNA, so daß mehr IL-2 synthetisiert wird. Dieses IL-2 steht auch Nachbarzellen zur Verfügung. Gleichzeitig kommt es zur Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors. Die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor schließlich induziert die Proliferation der Zelle.

In den MLRs mit L-Zellen oder T-Zell-Hybridomen als Stimulatoren war eine Aktivierung über CD28 nicht möglich, da diese Stimulatoren keine kostimulatorischen Moleküle (CD80 bzw. CD86) exprimieren. Die Zugabe von exogenem IL-2 aber kann das CD28-Signal ersetzen: Zusammen mit einem starken TCR-Signal induziert auch IL-2 selbst die Synthese des hochaffinen IL-2-Rezeptors, bindet ihn anschließend und leitet damit ebenfalls eine Proliferation ein.

Eine CD28-induzierte Kostimulation ist allerdings nicht identisch mit einer IL-2-stimulierten: Erstens hat die CD80/CD28- bzw. CD86/CD28-Interaktion – neben der Stimulation der IL-2-Synthese – weitere Effekte, z.B. wirkt sie antiapoptotisch auf die reagierenden Zellen (IEZZI et al. 1998). Zweitens ist in den über CD28-aktivierten Kulturen weniger IL-2 verfügbar, so daß es hier räumlich begrenzter wirkt als bei exogener IL-2-Gabe.

Diese Unterschiede zwischen der CD28- und der IL-2-Stimulation fielen bei der dritten in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie, den Ratte-CD80-transfizierten Maus-Mastzellen P815-rCD80 (MAEDA et al. 1997) auf, da sie die Responderzellen über die CD80/CD28-Interaktion aktivieren können. Der antiapoptotische Effekt schränkt den Zelltod in den Kulturen stark ein, so daß die Ergebnisse bei Verwendung der P815-rCD80-Stimulatoren deutlicher und dadurch ausagekräftiger sind als bei Verwendung der L-Zellen oder der T-Zell-Hybridome.

Die niedrige IL-2-Konzentration erhöht die Spezifität der MLRs: Wie in Tabelle 3.4, S. 91 (Versuch P1) ersichtlich, ist eine präferentielle Expansion von $V\alpha 8.2$ -T-Zellen in Reaktion auf A^f , nicht aber in Reaktion auf A^a , nur dann sehr deutlich, wenn den Kulturen kein IL-2 zugegeben wird. Bei exogener IL-2-Gabe dagegen ist die AV8S2-Zell-Expansion nach Stimulation mit A^a von der mit A^f nicht unterscheidbar. Auch ist die Proliferation der T-Zellen insgesamt mit IL-2 viel stärker als ohne IL-2, und eine blastoide Transformation tritt sogar in Kulturen

sind, aus der Maus und die aktivierbaren Zellen („Responderzellen“) aus der Ratte. Die endogenen Wirts- also Maus-MHC-Moleküle sind daher für die Responder fremd, also „xeno“.

ohne Stimulatorzellen aber mit IL-2 auf, nicht aber in Kulturen ohne IL-2 (Daten nicht gezeigt). Die Proliferation ohne Stimulatorzellen ist vermutlich möglich, da 30 -40 % der Ratte-CD8-Zellen die IL-2R β -Kette exprimieren, die gemeinsam mit der γ -Kette, die konstitutiv exprimiert ist, schon einen minimalen funktionellen IL-2R ergibt (PARK et al. 1996). Möglicherweise können durch IL-2-Gabe auf diese Weise sogar Zellen aktiviert werden, die nur ein schwaches TCR-Signal erhalten.

Diese Beobachtungen und Überlegungen geben Anlaß für die folgende Hypothese der Erhöhung der Spezifität in den MLRs, wenn den Kulturen kein IL-2 von außen zugegeben wird: Solange die IL-2-Konzentration limitierend wirkt, proliferieren nur die T-Zellen, deren TCR/pMHC-Interaktion für die TC-Aktivierung optimal ist. Das sind bei Stimulation durch A^f die AV8S2⁺-Zellen mit höherer Frequenz als die AV8S2⁻-Zellen (s.o.). Sobald IL-2 im Überfluß vorhanden ist, profitieren vermutlich auch viele andere Zellen von diesem Wachstumssignal, das wahrscheinlich über den minimalen IL-2-Rezeptor perzipiert werden kann. Die ausgelöste Massenproliferation (s.o.) überdeckt dann den spezifischen A^f-Effekt, so daß die präferentielle Expansion AV8S2-positiver T-Zellen nicht mehr sichtbar ist (s.o.). IL-2-Zugabe führt also vermutlich aufgrund der Induktion einer Massenproliferation zu einer unspezifischeren TC-Stimulation als die alleinige Kostimulation über CD28. Das zeigt, wie kritisch die Kostimulation ist, wenn nicht nur generell eine starke Proliferation induziert, sondern die Expansion einer bestimmten TC-Subpopulation beobachtet werden soll.

Sowohl aufgrund der geringeren Apoptose wie auch unter dem Gesichtspunkt der Erhöhung der Spezifität durch Verknappung des IL-2 ist die Kostimulation mittels CD28 derjenigen über IL-2 in MLRs vorzuziehen.

Der Maus-MHC der „Wirtszellen“ (**Xeno-MHC**) beeinflusst allerdings ebenfalls die Aussagekraft der MLRs. MHC-Moleküle von Maus und Ratte unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Grundstruktur. Daher lassen sich Ratte-T-Zellen auch durch Maus-MHC-Moleküle aktivieren. Neben dem zu überprüfenden eingebrachten Ratte-MHC-I-Molekül wirken sich also außerdem die endogenen Maus-MHC Kl. I-Moleküle der Stimulatoren auf den Prozentsatz der AV8S2-Blasten der „Responder“ aus: Je niedriger aber der Anteil V α 8.2-positiver Blasten bei der Stimulation mit untransfizierten „Wirtszellen“ ist, desto deutlicher kann eine durch eingebrachte MHC-Moleküle induzierte Expansion sichtbar gemacht werden.

P815-rCD80-Zellen (H-2^d) sind auch in dieser Hinsicht optimale Stimulatoren: Untransfiziert bewirken sie sogar eine Art „Unterselektion“ der AV8S2-Zellen: Der Anteil V α 8.2-positiver Zellen sinkt von ursprünglich circa 2,5 % in den kleinen, nicht reagierenden Zellen, auf ungefähr 1 % in den Blasten (Abb. 3.24, S. 92 und Tab. 3.4, S. 91). Untransfizierte L-Zellen (H-2^k) dagegen be-

wirken, daß circa 2 % der Blasten V α 8.2-positiv sind (Abb. 3.21, S. 85). Der Prozentsatz der AV8S2-Zellen bei den Blasten unterscheidet sich nicht von dem bei den kleinen Zellen (ungef. 2 %). Dieser Maus-MHC verursacht demnach keine Über- bzw. Unterselektion von AV8S2-Zellen. Das aus einer Fusion von Ratte- mit Mauszellen hervorgegangene T-Zell-Hybridom 35/1 exprimiert H-2^k und RT1^l. Bei Stimulation damit verwenden knapp 3 % der „Responder“-Blasten V α 8.2 (Abb. 3.3, S. 88). THO35/1 bewirkt möglicherweise eine schwache Überselektion.

Allerdings sind nicht nur die MHC-I-Proteine der Maus-„Wirtslinie“ wichtig, sondern – in bezug auf die Hypothese des Einflusses von IL-2 in der Kultur – ist auch das Fehlen von MHC-II-Molekülen bei Stimulation über kostimulatorische Moleküle relevant: MHC Kl. II-Proteine aktivieren CD4-T-Zellen, die sehr gute IL-2-Produzenten sind. Würden auch CD4-T-Zellen aktiviert, wäre die IL-2-Konzentration in den Kulturen höher und der Effekt der präferentiellen Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen in Reaktion auf A^f wiederum nicht gut erkennbar. Also ist auch das Fehlen von MHC Kl. II-Moleküle auf den Stimulatorzellen wichtig, um aussagekräftige MLRs zu erhalten.

Technisch für die MLRs relevant waren also die Art der Kostimulation und die Xeno-MHC-Moleküle der „Wirtszelllinie“.

Nun soll auf die mit den MLRs erzielten Ergebnisse eingegangen werden: Die MLR-Daten mit den P815-rCD80-Stimulatoren zeigen sehr klar die präferentielle Expansion V α 8.2-positiver Zellen durch A^f-exprimierende-, nicht aber durch A^a- oder A2^f-exprimierende Stimulatoren (Abb. 3.24, S. 92). Die Expression des A2^f-Moleküls ist zwar schwächer als die der anderen eingebrachten Ratte-MHC Kl. I-Gene (halb so stark, Abb. 3.23, S. 90), das erklärt aber nicht das absolute Fehlen einer Überselektion. So wurde beschrieben, daß die Kl. I- und II-Expressionshöhe nicht mit der stimulatorischen Fähigkeit in einer MLC korreliert ist (ASHMAN et al. 1987).

Weiterhin wurde das A2^f-Protein als funktionelles MHC Kl. Ia-Gen ohnehin bereits ausgeschlossen: Es wird nicht von f-alloreaktiven CD8-T-Zellen erkannt, vermutlich da seine *in vivo*-Expression zu gering ist, so daß es überhaupt keine allo-CTLs stimulieren kann. Die Zusammenschau der Daten aus Abschnitten 4.1 und 4.2 zeigt also deutlich, daß das A^f-Genprodukt die präferentielle Expansion V α 8.2-exprimierender CD8-T-Zellen in der Alloreaktion bewirkt.

Präferentielle Expansion bedeutet, daß bei Stimulation mit A^f besonders viele AV8S2-T-Zellen aktiviert werden und zu proliferieren beginnen. Diese begünstigte Aktivierung der AV8S2-Zellen bei A^f-Stimulation ist vermutlich durch eine optimale Interaktion der beteiligten spezifischen Rezeptoren bedingt, die eine gute Weiterleitung des TCR/pMHC-Signals ins Zellinnere erlaubt. Grundlage einer optimalen Interaktion ist die passende Feinstruktur der interagierenden Kompo-

nenten, also von CDR1/2 des V α 8.2-Segments und von den α -Helices des A^f-Moleküls, die im folgenden Abschnitt besprochen werden sollen.

4.3 Kartierung der in der präferentiellen Interaktion erkannten Regionen auf A^f und AV8S2.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde A^f als das Molekül identifiziert, das die präferentielle Expansion V α 8.2-positiver CD8-T-Zellen in der Alloreaktion stimuliert. In diesem Abschnitt sollen die für diese besonders begünstigte Interaktion (präferentielle Interaktion) relevanten Aminosäuren der beteiligten Moleküle (MHC und TCR) eingegrenzt werden.

Zunächst zum **MHC**: A^f unterscheidet sich von A^a extrazellulär in nur **sieben Aminosäuren** (Tab. 3.5, S. 94). Diese sieben Aminosäuren liegen gebündelt auf zwei Regionen des MHC-Moleküls (Abb. 4.1, S. 120, A). Durch MLRs mit A^a- bzw. A^f-transfizierten Stimulatorzellen konnte die präferentielle Interaktion mit V α 8.2-positiven CD8-T-Zellen in der Alloreaktion auf diese **beiden A^f-Regionen** begrenzt werden, da A^a im Gegensatz zu A^f keine präferentielle Expansion von AV8S2-Zellen induziert (Abb. 3.24, S. 92).

Durch einen Vergleich dieser sieben Aminosäuren mit den Daten aus den drei bekannten Kristallmodellen (GARCIA et al. 1996; GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998) konnten weitere Informationen erhalten werden: Besonders relevant für die AV8S2/A^f-Interaktion, da direkt TCR-kontaktiert, sind vermutlich die vier Positionen AS 62, 65 und 69 von „Region I“ und AS 167 von „Region II“. Das läßt sich gut in Abb. 4.1, S. 120 (A) erkennen: nur diese vier Aminosäuren – hier violett markiert – sind zum TCR ausgerichtet. Indirekt beeinflussen die TCR-Erkennung allerdings auch AS 63 und 70 von „Region I“, da sie Bestandteile der B-Tasche sind, die das Spektrum MHC-bindender Peptide beeinflußt. Ganz ausgeschlossen werden für die AV8S2/A^f-Interaktion kann vermutlich AS 169 von „Region II“, da für sie aufgrund ihrer Lage weder TCR- noch Peptid-Kontakte möglich sind (s. Abb. 4.1, S. 120, A).

Durch die Generation von Hybridmolekülen, die jeweils für eine Region „a“ und für die andere „f“ sind, wurde es möglich, den Einfluß von „Region I“ und „Region II“ getrennt zu analysieren. Durch MLRs mit diesen Hybridmolekülen konnte gezeigt werden, daß beide Regionen einen etwa **gleich starken** Beitrag zur präferentiellen Expansion V α 8.2-positiver Zellen leisten (Abb. 3.31, S. 104). Das bedeutet, daß AS 167 alleine – da sie die einzige relevante Aminosäure von „Region II“ darstellt – eine genauso starke AV8S2-Zell-Expansion zu stimulieren vermag, wie die Aminosäuren von „Region I“ gemeinsam (Abb. 4.1, S. 120, A). Eine weitere Kartierung von „Region I“ durch Punktmutationen wurde nicht

unternommen.

Die **Abbildung 4.1, S. 120** zeigt im obersten Bereich (**A**) die Aminosäuren, die A^a von A^f unterscheiden. Die – gemäß der drei Kristallstrukturen – direkt TCR-kontaktierten Aminosäuren sind dabei violett hervorgehoben.

In Teil (**B**) sind die in den drei Kristallen beschriebenen MHC-Kontakte von CDR1α- bzw. CDR3α gezeigt.

Im untersten Abschnitt (**C**) dieser Abbildung sind Schemata der TCR-pMHC-Kontaktfläche dargestellt. Dabei ist links mit dem Pfeil die TCR-Drehung gezeigt, die notwendig wäre, wenn CDR2α AS 167 aus „Region II“ von A^f kontaktieren sollte. Rechts ist gezeigt, daß der TCR seine Orientierung über pMHC umkehren müßte (Drehung um 180 °), wenn CDR1β und CDR3β in Kontakt mit den relevanten A^f-Regionen treten sollten.

Alle Kontaktinformationen sind den drei bekannten TCR/pMHC-Kristallstrukturen entnommen (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998).

Auf **TCR**-Seite zeigt schon die Beobachtung der präferentiellen Expansion Vα8.2-Segment positiver CD8-T-Zellen durch RT1^f (TORRES-NAGEL et al. 1994), den wichtigen Einfluß der in diesem Segment codierten CDR-Schleifen (CDR1/2α). Damit ist aber ein zusätzlicher Beitrag der übrigen vier TCR-CDRs bei der präferentiellen Interaktion von AV8S2-T-Zellen mit A^f in der Alloreaktion nicht ausgeschlossen und die Gewichtung des CDR1α-Beitrags gegenüber CDR2α unbekannt.

Zur Beantwortung dieser Fragen, also für die Kartierung der präferentiellen Interaktion zwischen A^f und AV8S2 auch auf TCR-Seite, sollen im folgenden zunächst die in den publizierten TCR/pMHC-Kristallstrukturen beschriebenen Kontaktpunkte mit den Daten dieser Arbeit verglichen werden, dann frühere Beobachtungen herangezogen werden (TORRES-NAGEL et al. 1997) und schließlich unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe, die durch Untersuchungen an Sprague/Dawley-Ratten gesammelt werden konnten:

Zunächst sollen die – in den drei bekannten **Kristallstrukturen** beschriebenen (GARCIA et al. 1998; GARBOCZI et al. 1996; DING et al. 1998) – TCR-Kontakte zu den relevanten Aminosäuren der beiden MHC-Regionen diskutiert werden (Tab. 3.5, S. 94). Die Kristalldaten erlauben zwar keine Aussage darüber, welche CDRs in unserem Spezialfall der TCR/MHC-Interaktion tatsächlich relevant sind, aber sie sagen etwas darüber aus, welche CDRs theoretisch involviert sein können.

Zu „Region I“ des A^f-Moleküls werden neunzehn CDR3α-Kontakte beschrieben, vier CDR1α-Kontakte und zwei CDR2β-Kontakte. CDR3α scheint für die Kontaktierung dieser MHC-Region aufgrund der Vielzahl der dazu beschriebenen

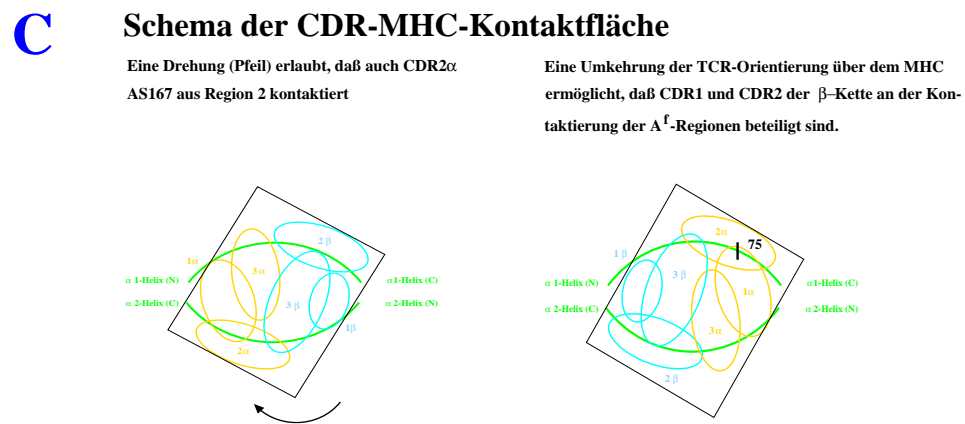
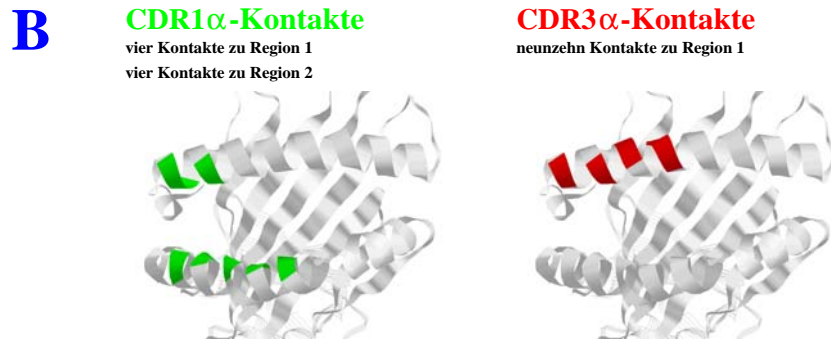
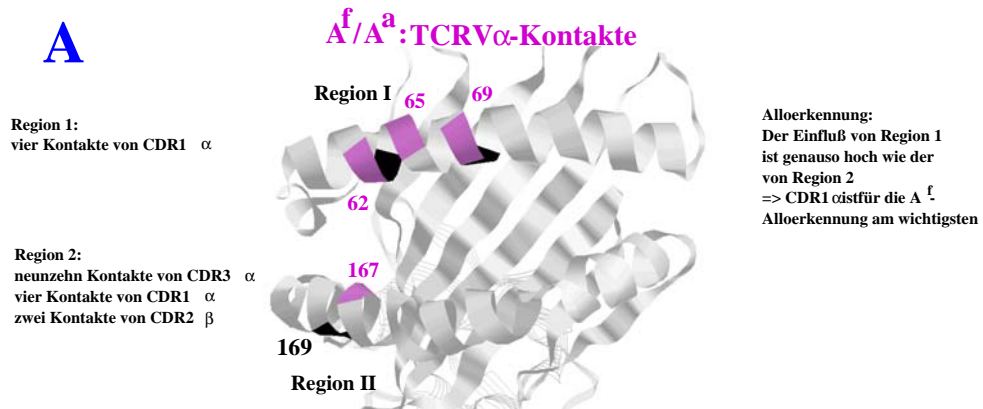


Abbildung 4.1: Erläuterung siehe S. 119

Kontakte besonders relevant zu sein, umso mehr, da AS 69 ausschließlich von CDR3 α kontaktiert wird (Tab. 3.5, S. 94). Die exakte Aufteilung der Bedeutung der einzelnen CDRs für die „Region I“-Kontaktierung läßt sich durch die Kristalldaten allerdings nicht weiter aufklären, da in „Region I“ keine Punktmutationen eingeführt wurden.

Zu „Region II“ werden fünf Kontakte beschrieben, alle von CDR1 α ausgehend. Da bei der Alloerkennung von A^f durch AV8S2-positive CD8-T-Zellen „Region II“ genauso wichtig ist wie „Region I“ (Abb. 3.31, S. 104), geben diese Daten einen Hinweis darauf, daß CDR1 α bei der präferentiellen Interaktion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen mit A^f in der Alloreaktion der dominante Partner ist, da diese TCR-Schleife alleine das gleiche Expansionssignal vermittelt wie CDR3 α , CDR2 β und wiederum CDR1 α gemeinsam (Abb. 4.1, S. 120, A).

Nun zu den restlichen drei CDRs, für die keine Kontakte zu den A^f -Regionen beschrieben sind: CDR2 α – das im V α 8.2-Segment codiert ist – könnte AS 167 von „Region II“ kontaktieren, wenn sich der TCR zum MHC-Molekül stärker verdrehen würde, so daß der eingeschlossene Winkel noch kleiner als 45 ° (wie für den 2C TCR beobachtet) wird (Abb. 4.1, S. 120, C).

Für CDR3 β und CDR1 β ist – gemäß den Kristalldaten – kein Kontakt zu den MHC-Regionen möglich, wenn der TCR seine Orientierung über dem MHC nicht um 180 ° dreht (Abb. 4.1, S. 120, C). Eine Orientierungs-Voraussetzung ist dabei die diagonale Bindung des TCR an MHC, da die Oberfläche von MHC Kl. I-Molekülen zwei hervorstehende Gebiete hat: die N-Termini der MHC-Helices, zwischen die sich der TCR einpassen muß (s. Abb. 1.9, S. 24). Damit aber ist eine Umkehrung der Orientierung (180 °) des TCR über dem MHC theoretisch nicht ausgeschlossen und sie wurde in der Literatur bereits vorgeschlagen, um die Ergebnisse funktioneller Studien mit den Kristalldaten in Einklang bringen zu können (SIM et al. 1997)¹².

Allerdings ist eine derartige 180 ° Drehung sehr unwahrscheinlich, da durch die CDR1/2-Schleifen des TCR vorgeformte Kontakte zu konservierten Aminosäuren des MHC-Moleküls vorgegeben sind (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; MERKENSCHLAGER et al. 1997), die dann unterbrochen werden. Für unseren Spezialfall der AV8S2/ A^f -Interaktion kann diese Drehung sogar ausgeschlossen werden: Aufgrund der präferentiellen Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen durch A^f nicht aber A^a ist klar, daß AV8S2 mit den A^f -Regionen I und II, die A^f von A^a unterscheiden, in Kontakt treten muß. Das aber wäre bei einer derartigen Umkehr der TCR-Orientierung über dem MHC nicht möglich (Vgl. Abb. 4.1).

¹²Aufgrund funktioneller Daten wird in dieser Veröffentlichung eine Interaktion von V α 3.2 (also CDR1 α und CDR2 α) mit AS 75 auf der MHC α 1-Helix (auf Abb. 4.1 (C) liegt diese AS auf der rechten Seite der MHC α 1-Helix) gefordert. Diese Interaktion ist allerdings nur möglich, wenn der TCR seine Orientierung über dem MHC um 180 ° dreht, wie in Abb. 4.1 (C) dargestellt.

Resümierend kann zu einem Vergleich der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit den Kristalldaten bemerkt werden, daß der Hauptbeitrag der Kontaktierung der beiden A^f-Regionen durch AV8S2-T-Zellen in der Alloerkennung wahrscheinlich von CDR1 α ausgeht und daß ein weiterer Beitrag vermutlich von CDR3 α geleistet wird. CDR1 und CDR3 der TCR β -Kette sind vermutlich nicht an der Kontaktierung der beiden MHC-Regionen beteiligt.

Die Annahme einer geringen Bedeutung der TCR β -Kette in der A^f-Alloerkennung durch AV8S2-positive CD8-T-Zellen wird auch durch **frühere Beobachtungen** gestützt (TORRES-NAGEL et al. 1997): Es konnte gezeigt werden, daß für AV8S2-positive A^f-alloreaktive CD8-T-Zellen keine selektive V β -Paarung notwendig ist, daß V β also hierbei keine entscheidenden Kontakte knüpft. Damit sind die V-Segment codierten CDR1- und CDR2- β -Schleifen als kritische Teilhaber der präferentiellen Interaktion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen mit A^f ausgeschlossen.

Weiterhin wurde von Torres-Nagel et al. 1997 gezeigt, daß LEW.1F-alloreaktive V α 8.2-positive CD8-T-Zellen bestimmte CDR3 α -Sequenzmotive verwenden, hingegen nicht die CDR3 α -Sequenzen von AV8S2-Zellen, die in der thymischen Selektion durch RT1^f präferentiell expandiert wurden (TORRES-NAGEL et al. 1997). Möglicherweise treten die charakteristischen Aminosäuren dieser CDR3 α -Motive wiederholt auf, da sie einen zusätzlichen Beitrag zur präferentiellen A^f-Erkennung leisten. Sie könnten die AS 62, 65 und 69 von „Region I“ kontaktieren (s. Abb. 4.1, S. 120).

Durch die Kombination der Kristalldaten und der Daten dieser Veröffentlichung wurde dargelegt, daß höchstwahrscheinlich die gesamte TCR β -Kette für die präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen durch A^f in der Alloreaktion irrelevant ist. Weiterhin wurde dargelegt, daß CDR3 α AV8S2-positiver CD8-T-Zellen vermutlich einen Beitrag zur präferentiellen A^f-Bindung liefert, daß die hauptsächliche A^f-Kontaktierung aber von CDR1 α ausgeht.

Weitere Hinweise zur Gewichtung der einzelnen CDRs wurden durch die Untersuchung der **Sprague/Dawley**-Auszucht¹³-Ratten (SD-Ratten) gewonnen: CD8-Zellen, die das AV8S2-Allel der SD-Ratte (AV8S2^{SD}) tragen expandieren bei A^f-Alloerkennung ebenso präferentiell wie CD8-Zellen die das AV8S2-Allel der LEW-Ratte tragen. AV8S2^{SD} weicht von AV8S2^{LEW} jedoch in zwei Mutationen auf Aminosäureebene ab (Torres-Nagel et al., unveröffentlicht). Die eine Mutation liegt an einer für die MHC-Erkennung irrelevanten Stelle (A65T), die andere aber in CDR2 α (S53N). Letztere führt dazu, daß AV8S2^{SD} die Konsensussequenz der gesamten AV8-Familie trägt. Da die vierzehn AV8-Familienmitglieder aber nicht alle in gleicher Weise durch A^f expandieren, wie AV8S2 (Torres-Nagel et

¹³Auszucht-Ratten sind im Gegensatz zu den sonst verwendeten Inzucht-Ratten genetisch nicht identisch.

al., unveröffentlicht), läßt das den Schluß zu, daß CDR2 α an der präferentiellen A^f -Erkennung nicht beteiligt ist.

Bei einer Zusammenschau der Überlegungen dieses gesamten Abschnitts kann für die MHC-Seite gesagt werden, daß die präferentielle Interaktion $V\alpha 8.2$ -positiver CD8-T-Zellen mit A^f auf zwei Regionen eingegrenzt werden kann, wobei AS 167 von „Region II“ alleine bereits einen wichtigen Beitrag zur AV8S2-Zell-Expansion leistet.

Auf TCR-Seite konnte die herausragende Bedeutung von CDR1 des $V\alpha 8.2$ -Segments bei der präferentiellen Interaktion mit A^f dargelegt werden, wohingegen CDR2 dieses Segments keinen spezifischen Beitrag leistet. Eine Beteiligung von CDR3 α an der präferentiellen Interaktion von AV8S2-positiven CD8-T-Zellen mit A^f bei dessen Alloerkennung ist sehr wahrscheinlich. Eine Mitwirkung der TCR β -Kette bei der präferentiellen A^f -Erkennung kann hingegen als sehr unwahrscheinlich bezeichnet werden.

Da diese präferentielle Interaktion hauptsächlich über die schon in der Keimbahn vorhandene CDR1-Sequenz des $V\alpha 8.2$ -Gensegments zustande kommt, weist dieses Segment eine Art „inhärenter Präaffinität“ zu A^f auf (eine durch die Sequenz dieses Segments vorgegebene Affinität).

Eine „inhärente Präaffinität“ von CDR1/2 α zu MHC Kl. I ist auch aus der Literatur bekannt: Präselektionsthyozyten weisen das gleiche hohe Ausmaß an MHC-Alloerkennung auf wie reife SP-Thymozyten (MERKENSCHLAGER et al. 1997; ZERRAHN et al. 1997). Das bedeutet, daß sich eine MHC-Erkennung durch Koevolution von CDR1/2 mit den MHC-Molekülen herausentwickelt hat (also vorgegeben ist) und nicht durch die Rearrangements der TCR-Segmente während der Reifung des TC-Repertoires in der positiven Selektion erworben wird.

Diese durch CDR1/2 bewirkte Präaffinität wird durch die in den Kristallmodellen der TCR/pMHC-Interaktion beschriebenen Kontaktpunkte direkt verständlich: CDR1 und CDR2 v.a. der α -Kette knüpfen die meisten Kontakte zum MHC-Molekül und dabei hauptsächlich zu konservierten MHC-Aminosäuren (Tab. 4.4, S. 124). Diese Kontakte sind zu jedem MHC-Molekül möglich, da die TCR/pMHC-Orientierung immer gleich ist, und sie bedingen dadurch die „inhärente Präaffinität“ der CDR1- und CDR2-Schleifen des TCR zu MHC-Molekülen (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; GARBOCZI und BIDDISON 1999).

In dem in dieser Arbeit behandelten Spezialfall der AV8S2/ A^f -Interaktion ist das TCR- $V\alpha 8.2$ -Segment ganz besonders nahe an die Erkennung des A^f -Moleküls herangeführt worden, die AV8S2-Präaffinität zu A^f ist also ganz besonders hoch. Neben den in allen V-Segmenten codierten Kontakten zu konservierten MHC-Aminosäuren kommen hier vor allem spezifische CDR1 α - – und auch nicht V-Segment codierte CDR3 α - – Kontakte zu polymorphen A^f -Aminosäuren hinzu. Diese verursachen die präferentielle Erkennung von A^f und veranlassen zu-

CDR	MHC-Kontakte	Peptid-Kontakte
CDR1 α	20	14
CDR2 α	19	-
CDR3 α	21	23
CDR1 β	5	6
CDR2 β	9	-
CDR3 β	9	19
CDR1/CDR2/CDR3	25/28/30	20/-/42
α/β	60/23	37/25
insgesamt	83	62

Tabelle 4.4: Die Anzahl der Kontakte der TCR-CDR-Schleifen zu MHC bzw. Peptid. Diese Tabelle summiert Daten der drei bekannten Kristallstrukturen (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998).

sammen mit den TCR-Kontakten zu konservierten MHC-Resten und zufällig vorhandenen unspezifischen TCR-Kontakten die Aktivierung A^f-reaktiver AV8S2-Zellen.

4.4 Die Bedeutung antigener Peptide bei der A^f-Alloerkennung durch V α 8.2-positive CD8-T-Zellen.

Für den Spezialfall der A^f-Alloerkennung durch AV8S2-Zellen kann – durch das Auftreten funktionell unterschiedlicher TAP-Allele – eine Aussage über die Bedeutung der Peptide für diese Erkennung getroffen werden:¹⁴

Das Maus-TAP und das Ratte-TAP2B-Allel sind im Gegensatz zum Ratte-TAP2A-Allel nicht fähig, Peptide mit basischen C-Termini (P8/9) zu transportieren, die von MHC-Molekülen mit sehr saurer F-Tasche wie A^a und A^f¹⁵ verlangt werden (JOLY et al. 1994; POWIS et al. 1996). Das führt bei der Koexpression von A^a (und voraussichtlich auch A^f) zusammen mit dem TAPB-Allel zur Beladung des MHC-Moleküls mit anderen Peptiden als bei Koexpression mit TAPA. Primär betroffen ist dadurch die Aminosäure P8/9 der MHC-gebundenen Peptide. Da aber der veränderte P8/P9-Anker die Bindung eines anderen Peptid-Spektrums nach sich zieht, ist bei Koexpression mit TAPB anstelle von TAPA auch die Auftrittswahrscheinlichkeit der Aminosäuren an den Positionen P2, P3, P4 und P7

¹⁴TAP ist der Peptidtransporter, der zytosolische Peptide in das ER transportiert, so daß MHC-Moleküle damit beladen werden können (vgl. Abschn. 1.2.3, S. 18).

¹⁵Eine TAP-Abhängigkeit wurde bis jetzt nur für das A^a-Molekül gezeigt. Für das A^f-Molekül ist sie aber aufgrund der Übereinstimmung der F-Tasche höchst wahrscheinlich.

Peptidpositionen	TAP-beeinflußte Positionen	A ^α -Ankeramino-säuren	Anzahl der TCR-Kontakte	Anzahl der CDR1α-Kontakte
P1	-	-	3	3
P2	+	+	2	2
P3	(+)	-	0	0
P4	(+)	-	15	2
P5	-	-	21	7
P6	-	-	7	0
P7	+	+	7	0
P8/9	+++	+++	7/0	0/0

Tabelle 4.5: CDR1α, das für die präferentielle Interaktion mit A^f durch AV8S2-positive CD8-T-Zellen in der Alloreaktion hauptverantwortlich ist, kontaktiert TAP-Allel-beeinflußte Peptidamino-säuren (rot).

Die TAP-Allel-veränderten Peptidpositionen von MHC KI. I-Molekülen mit saurer F-Tasche und die A^α-Ankeramino-säuren wurden aus (POWIS et al. 1996) entnommen. Die Kontakte des TCR bzw. der CDR1α-Schleife zu den einzelnen Peptidpositionen wurden aus der Summation der Daten der drei bekannten Kristallstrukturen gewonnen (GARBOCZI et al. 1996; GARCIA et al. 1998; DING et al. 1998).

verändert (POWIS et al. 1996), Tab. 4.5, erste Spalte.

A^f in der LEW.1F-Ratte (TAPA) präsentiert also andere Peptide als A^f auf den P815-rCD80-Zellen (Maus-TAP). Die präferentielle Expansion der AV8S2-Zellen mit A^f in der Alloreaktion kann aber für beide Stimulatoren deutlich gezeigt werden (Abb. 3.4, S. 63 und 3.24, S. 92).

CDR1α nun, das die präferentielle Interaktion hauptsächlich bedingt, kontaktiert gemäß den Kristalldaten die TAP-beeinflußten Peptidpositionen P2 und P4 (Tab. 4.5, S. 125). Die Unabhängigkeit der präferentiellen Expansion von den unterschiedlichen Peptidspektren auf den Ratte-MHC-I-Molekülen der verschiedenen Stimulatoren ist also nur verständlich, wenn CDR1α bei der präferentiellen A^f-Erkennung vor allem MHC-Kontakte und weniger Peptid-Kontakte eingeht. Diese Beobachtung impliziert, daß der Affinitätsbeitrag der Peptide für die präferentielle Interaktion mit A^f durch AV8S2-positive CD8-T-Zellen vermutlich gering und Peptidsequenz-unspezifisch ist.

Die Aussage, daß Peptidbindungen für die präferentielle A^f/AV8S2-Interaktion weniger wichtig sind, erlaubt es, die A^f-„Region 1“-Positionen 63 und 70 differenzierter zu betrachten: Sie zählen zu den Positionen, die das neutrale A^α-Molekül von A^f unterscheiden und daher potentielle Verursacher der präferentiellen Interaktion mit AV8S2 sind. Sie sind Komponenten der B-Tasche und können die TCR-Erkennung nur indirekt, über die bindenden Peptide beeinflussen. Da

– wie bereits dargelegt – die Peptid-Erkennung für die präferentielle AV8S2/ A^f -Interaktion nicht ausschlaggebend ist, zeigt das implizit, daß die Aminosäuren 63 und 70 für die präferentielle Interaktion von AV8S2-CD8-T-Zellen mit A^f in der Alloreaktion keine große Rolle spielen.

Sind diese Aussagen über die A^f -Alloerkennung durch AV8S2-Zellen auch gültig für die Alloerkennung allgemein? Für den 2.102-TCR konnte gezeigt werden, daß er das Peptid auf dem Allo-MHC (I-E^p) flexibler erkennt als das Peptid des spezifischen Liganden (I-E^k/Hb) (DANIEL et al. 1998). Das sei auf eine Verschiebung der Gewichtung der Peptid/MHC-Erkennung zugunsten der MHC-Erkennung zurückzuführen, die durch TCR-Kontakte zu polymorphen MHC-Aminosäuren zustande kommt (DANIEL et al. 1998). Diese Daten stimmen gut mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit überein, die ebenfalls zeigt, daß die Alloerkennung durch AV8S2-Zellen mehr durch TCR/ A^f - als durch TCR/Peptid-Kontakte vermittelt wird.

Es gibt allerdings auch in die entgegengesetzte Richtung weisende Resultate: So wurde beschrieben, daß ein MHC als Alloantigen erkannt wird, der sich vom Selbst-MHC nur in einer Aminosäure unterscheidet, die aber in einer Peptidbindungstasche liegt. Die direkten MHC-TCR-Kontakte sind hier also nicht betroffen. Vielmehr verursacht die Punktmutation am MHC die Bindung eines veränderten Peptidspektrums. In diesem Fall provozieren also ausschließlich die (indirekt) veränderten TCR/Peptid-Kontakte die Alloerkennung (JOYCE und NATHENSON 1996).

Alloerkennung kann demnach vermutlich durch ein kontinuierliches Spektrum an Möglichkeiten verursacht werden: Am einen Ende dieses Spektrums sind die MHC-Kontakte ausgeprägter, am anderen die Peptid-Kontakte. Der Spezialfall der präferentiellen Interaktion alloreaktiver AV8S2-T-Zellen mit A^f liegt gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit auf der MHC-Seite dieses Spektrums.

In diesem gesamten Kapitel (4) konnte dargelegt werden, daß das in dieser Arbeit klonierte A^f -Molekül die präferentielle Expansion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen in der Alloreaktion vermittelt. Für die präferentielle Interaktion AV8S2-positiver CD8-T-Zellen mit A^f konnten relevante Aminosäuren des A^f -Moleküls (62, 65, 69, 167) und Regionen des TCR (CDR1 α , CDR3 α) kartiert werden. Als vermutlich unwichtig für die präferentielle AV8S2-T-Zell/ A^f -Interaktion in der Alloreaktion konnten die Peptidsequenz und die CDR2 α - und TCR β -Ketten-Zusammensetzung beschrieben werden, da sie dazu keinen spezifischen Beitrag leisten.

In dieser Arbeit wurde – da experimentell leichter handhabbar – ausschließlich die Alloerkennung von A^f durch AV8S2-CD8-T-Zellen behandelt. Dennoch sind Schlußfolgerungen auch für AV8S2-CD8-T-Zellen möglich, die in der posi-

tiven thymischen Selektion durch A^f überselektiert werden: In der thymischen Selektion der LEW.1F-Ratte werden die AV8S2-Zellen, die in der LEW-Ratte A^f /Selbspeptid-alloreaktiv wären, durch die negative Selektion aussortiert, da die thymische Selektion eine mittlere TCR/pMHC-Interaktion verlangt (Abschn. 1.4.4.1, S. 29), die Alloerkennung aber eine hohe (Abschn. 1.4.4.2, S. 30 und 1.4.4.3, S. 31). Die AV8S2-Zellen der LEW.1F-Ratte müssen also eine geringere Affinität gegenüber A^f aufweisen als die A^f -alloreaktiven AV8S2-Zellen der LEW-Ratte. Folglich müssen sich die AV8S2-TCRs in beiden Fällen auch in ihrer strukturellen Zusammensetzung unterscheiden. CDR1 α ist beidesmal gleich, da es AV8S2-codiert ist. Es bleibt der spezifische CDR3 α -Beitrag¹⁶, der für die AV8S2-T-Zellen wegfallen kann, die im Thymus der LEW.1F-Ratte überselektiert wurden. Genau das konnte durch Ergebnisse unserer Gruppe auch gezeigt werden: Die CDR3 α -Schleifen von AV8S2-Zellen, die durch RT1 f überselektiert wurden, weisen keine spezifischen Sequenzmotive auf, die CDR3 α -Sequenzen von A^f -alloreaktiven AV8S2-Zellen hingegen schon (TORRES-NAGEL et al. 1997).

Die AV8S2-TCRs, die im Repertoire reifer LEW.1F-Thymozyten vorkommen, unterscheiden sich also von denen, die von LEW.1F-alloreaktiven AV8S2-T-Zellen verwendet werden in ihrer CDR3 α -Komposition und vermutlich dadurch in ihrer Affinität gegenüber A^f .

Eine interessante Besonderheit der A^f /AV8S2-Erkennung ist, daß AV8S2 schon alleine ausgiebige Bindungen mit A^f eingeht, so daß die CDR1 α - (und geringe CDR3 α)-Kontakte zu A^f nahezu ausreichen, um eine TC-Aktivierung zu veranlassen. Eine Folge dieses „nahen Heranführens“ des TCR-Segments an den MHC ist, daß ein sehr geringer zusätzlicher Affinitätsbeitrag eines fremden Peptids schon zur TC-Aktivierung führt. AV8S2⁺-Zellen würden also schon auf geringere Peptidveränderungen¹⁷ reagieren als AV8S2⁻-Zellen.

Wären in einem Individuum hauptsächlich T-Zellen vorhanden, die so nahe an die MHC-Erkennung herangeführt sind, dann könnte das zu den positiven Effekten einer verstärkten Immunreaktion und Krebsbekämpfung¹⁸ führen, da schon

¹⁶Die TCR β -Kette wurde als wichtiger Partner der pMHC-Kontaktierung durch die Kristalldaten und die Daten von Torres-Nagel et al. 1997 auch für die positive thymische Selektion ausgeschlossen. CDR2 α wird als möglicher Partner in der thymischen Selektion durch die Kristalldaten unwahrscheinlich und durch die Ergebnisse der SD-Ratte wurde CDR2 α zumindest für die Alloreaktion ausgeschlossen.

¹⁷Die Reaktion auf eine geringere Peptidveränderungen bedeutet z.B. eine Reaktion schon bei einer geringeren Konzentration an Fremd-Peptid oder eine Reaktion auf mehr verschiedene Fremd-Peptide (also auch Fremdpeptide, die sich von Selbst-Peptiden nur geringfügig unterscheiden).

¹⁸Entartete Zellen exprimieren zwar (außer bei Krebsinduktion durch Viren) nur Selbstproteine, diese aber verändert (z.B. trunziert) und unter veränderten Expressionsschemata. Diese minimalen Veränderungen präsentierter Peptide können von T-Zellen bemerkt werden, so daß Tumorspezifische CTLs generiert werden (ROITT 1994).

minimale Peptidveränderungen registriert würden.

Allerdings verursacht dieses „nahe Heranführen“ eines TCR-V-Segments an die MHC-Erkennung vermutlich auch stark negative Effekte, wie z.B. eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunität. Das könnte folgendermaßen aussehen: Im Laufe einer Infektion werden T-Zellen aktiviert, die mit den fremden Peptid-Antigenen reagieren. Diese T-Zellen können zusätzlich zur Reaktivität gegenüber Fremd-Antigen eine schwache Reaktivität (Kreuzreaktivität) gegen Selbst-Peptid/MHC aufweisen. Diese Kreuzreaktivität (auch molecular mimicry, Mimikry auf molekularer Ebene) würde unter normalen Umständen nicht zur TC-Aktivierung ausreichen. Wenn die Zelle aber durch das fremde Antigen bereits aktiviert wurde, ist nachfolgend ihr „Aktivierungs-Niveau“ herabgesetzt, so daß sie auch bei dem geringeren Stimulus durch Selbst-pMHC schon reagiert. Diese Kreuzreaktivität führt zu Autoimmunität (ROITT 1994).

Da in unserem Spezialfall die TCR-Erkennung sehr nahe an die MHC-Erkennung herangeführt ist – ein marginaler Peptidbeitrag reicht zur TC-Aktivierung aus –, ist die Kreuzreaktivität der T-Zellen mit Peptiden, in diesem Fall Selbst-Peptiden, viel höher, da der gerinfügige Aktivierungsbeitrag durch eine Vielzahl von Peptiden geleistet werden kann. Ein derartig nahes Heranführen von TCRs an die MHC-Erkennung induziert folglich voraussichtlich eine erhöhte Autoimmunität und Allergieanfälligkeit.

Wie bereits erwähnt kann die Gewichtung der MHC- bzw. Peptid-Interaktionen bei ihrer Erkennung durch den TCR beträchtlich variieren. Bei der Erkennung von A^f durch AV8S2-positive CD8-T-Zellen hat der MHC-Beitrag höchste Gewichtung. Da die Evolution vermutlich die Heranführung von TCR-V-Segmenten an MHC-Moleküle optimal ausbalanciert hat, ist der in dieser Arbeit behandelte Spezialfall biologisch zwar voraussichtlich wenig günstig, aber seine Erforschung könnte zu einem erweiterten Verständnis der Autoimmunität führen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Klasse-I-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, von engl. major histocompatibility complex) interagieren mit T-Zellen: Während der thymischen Selektion formen sie das Repertoire reifer T-Zellen, in der Peripherie präsentieren sie diesen Antigene und in der künstlichen Situation einer Transplantation oder gemischten Lymphozytenreaktion (MLR, von engl. mixed lymphocyte reaction: Zellen eines Rattenstammes werden mit denen eines anderen (allo) stimuliert) provozieren sie eine starke Reaktion alloreaktiver T-Zellen.

In unserer Arbeitsgruppe war die präferentielle Expansion von T-Zellen durch den MHC der Lewis.1F-Ratte (RT1^f) beobachtet worden, die ein bestimmtes T-Zell-Rezeptor-V-Segment exprimieren, das V-Segment 8.2 der TCR- α -Kette (AV8S2). Diese RT1^f-stimulierte bevorzugte Proliferation (Zellteilung) AV8S2-positiver T-Zellen kann sowohl als Folge der thymischen Selektion im Repertoire reifer Lewis.1F (LEW.1F) T-Zellen festgestellt werden als auch bei der LEW.1F-Alloerkennung in einer MLR (TORRES-NAGEL et al. 1994). Da die bevorzugte Expansion AV8S2-positiver Zellen, nicht aber AV8S2-negativer, nur in den CD8-T-Zellen auftritt, wurde angenommen, daß sie von einem MHC Kl. I-Molekül der LEW.1F-Ratte induziert wird, da CD8-T-Zellen mit diesen interagieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Molekül der LEW.1F-Ratte, das die präferentielle Expansion von AV8S2-Zellen induziert, durch molekulare Klonierung zu identifizieren sowie die Kontaktpunkte der Interaktion zwischen dem MHC-Molekül und AV8S2 zu kartieren.

Über RT-PCR wurde das MHC-I-Gen A^f aus der LEW.1F-Ratte isoliert, sequenziert und zusammen mit einem anderen MHC-I-Gen aus der LEW.1F-Ratte (A2^f) analysiert, das von einer Arbeitsgruppe aus Babraham (Cambridge, UK) isoliert, sequenziert und uns zur Verfügung gestellt worden war (JOLY et al. 1998). Durch einen Nukleotidsequenz-Vergleich von A^f und A2^f mit bekannten Ratte-MHC-I-Genen konnte gezeigt werden, daß die Sequenzen beider charakteristisch für Ratte-MHC-I-Gene sind.

Nach der stabilen Expression beider MHC-Proteine in Zelllinien und T-Zellhybridomen konnte mit RT1^f-reaktiven Antikörpern gezeigt werden, daß A^f in der LEW.1F-Ratte stark exprimiert ist. Für A2^f konnte dieser Nachweis nicht geführt werden.

Durch einen Zytotoxizitätstest mit RT1^f-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten konnte nachgewiesen werden, daß A^f ein funktionelles MHC Kl. I-Gen der LEW.1F-Ratte ist. Für A2^f konnte das nicht demonstriert werden. Vermutlich ist es *in vivo* nur schwach exprimiert und wird daher von RT1^f-spezifischen Antikörper nicht gebunden und durch RT1^f-reaktive zytotoxische T-Lymphozyten nicht erkannt.

Beide Moleküle wurden mittels einer MLR auf ihre Fähigkeit untersucht, alloreaktive AV8S2-Zellen zu expandieren. A^f, nicht aber A2^f, regt bevorzugt AV8S2-positive CD8-T-Zellen zur Proliferation an. Damit war A^f als das Molekül identifiziert, das die präferentielle Expansion von AV8S2-CD8-T-Zellen in der Alloreaktion stimuliert.

Zur Kartierung der A^f/AV8S2-Interaktion wurden Hybridmoleküle aus A^a, einem bereits gut charakterisierten MHC-Molekül, und A^f gentechnisch hergestellt. A^a und A^f unterscheiden sich extrazellulär nur in sieben Aminosäuren, die auf zwei Regionen (I und II) begrenzt bleiben. Da nur A^f, nicht aber A^a eine präferentielle AV8S2-Zell-Expansion stimuliert, muß die charakteristische Kombination dieser sieben Aminosäuren (62, 63, 65, 69, 70, 167, 169) für die präferentielle Interaktion mit AV8S2 ausschlaggebend sein.

In den Hybridmolekülen wurde „Region II“ zwischen A^a und A^f reziprok ausgetauscht. Damit entstand ein Hybrid-a/f („Region I“ von A^a und „Region II“ von A^f) und ein Hybrid-f/a.

Durch MLRs mit Hybrid-exprimierenden Stimulatorzellen wurde aufgezeigt, daß beide Regionen zur präferentiellen Expansion AV8S2-exprimierender CD8-T-Zellen beitragen: Die AV8S2-Zell-Proliferation bei Stimulierung mit H-a/f bzw. mit H-f/a lag zwischen den Werten von A^f bzw. A^a. Beide Regionen werden also durch AV8S2-T-Zellen erkannt und leisten einen ähnlich hohen Beitrag zur AV8S2-Zell-Expansion.

Durch theoretische Überlegungen konnte die AV8S2/A^f-Interaktion weiter eingegrenzt werden. Auf MHC-Seite sind demnach v.a. die vier direkt TCR-kontaktierten Aminosäuren 62, 65, 69 und 167 relevant.

Für den TCR konnte dargelegt werden, daß die β -Kette zur präferentiellen Interaktion von AV8S2-Zellen mit A^f keinen spezifischen Beitrag leistet. Ebenso unbeteiligt an der spezifischen Interaktion mit A^f ist die Komplementarität-bestimmende Region 2 (CDR2, von engl. complementarity determining region) der α -Kette. Die charakteristischen Sequenzen von CDR1 α und CDR3 α dagegen sind für die präferentielle Expansion von AV8S2-positiven CD8-T-Zellen durch A^f essentiell.

Summary

The aim of this thesis was the investigation of interactions between major histocompatibility complex (MHC) proteins and T-cell receptors (TCR), in particular the extraordinary RT1^f/AV8S2-interaction: RT1^f is the MHC of the LEW.1F rat, AV8S2 is the 8.2 V-segment of the TCR- α chain. It was shown previously that RT1^f preferentially expands AV8S2 expressing T-cells in positive thymic selection in the LEW.1F rat (overselection) as well as AV8S2 cells alloreactive to RT1^f (TORRES-NAGEL et al. 1994). As the preferential AV8S2 expansion was only detected in the CD8 T-cells, a MHC class I molecule of the LEW.1F rat was postulated to be responsible for the overselection.

In this thesis the MHC I molecule of the LEW.1F rat promoting preferential expansion of AV8S2 CD8 T-cells in allorecognition was identified. To this end a MHC I molecule of the LEW.1F rat, A^f, was cloned and sequenced. Together with A2^f, another MHC I molecule of the LEW.1F rat, cloned and sequenced by a group from Babraham/UK, A^f was expressed in various cell lines and hybridomas.

The two molecules were tested for recognition by RT1^f-reactive antibodies and cytotoxic T-lymphocytes. By these criteria A^f was defined as a MHC class I molecule of the LEW.1F rat whereas A2^f was not. The ability to overselect AV8S2 CD8 T-cells was examined by MLRs (mixed lymphocyte reactions). Preferential interaction of this TCR segment with A^f but not A2^f has therefore been demonstrated. Thus A^f is the molecule preferentially expanding AV8S2 cells.

To identify the A^f/AV8S2-contact points hybrids between A^a and A^f were generated: Extracellularly, A^a differs from A^f in only seven aminoacids, which are clustered in two different regions (region I and II). Yet A^a is not able to promote preferential expansion of AV8S2 CD8 T-cells. Therefore the specific combination of the seven aminoacids differing between the two molecules are crucial in the observed preferential AV8S2 reactivity of A^f. In generating hybrids differing in these regions, equal contributions of both regions for recognition by AV8S2 RT1^f-reactive CD8 T-cells could be demonstrated.

By theoretical implication the A^f/AV8S2 interaction points could be narrowed down further: On the side of the MHC, solely the presumably directly TCR-

contacted MHC aminoacids 62, 65, 69 and 167 are likely to be involved in AV8S2-cell expansion.

On TCR side, the β -chain is not involved in specific A^f interaction. Only complementarity determining regions 1 and 3 of the TCR- α chain are essential for preferential interaction with A^f by AV8S2 positive CD8 T-cells.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Der MHC von Maus, Ratte und Mensch im Vergleich.	11
1.2	Ein MHC Kl. I-Molekül.	14
1.3	Ein MHC Kl. I-Molekül, die Domänen sind farbig markiert. . . .	15
1.4	Ein Ratte-MHC Kl. I-Molekül, die kanonischen Reste sind hervorgehoben.	16
1.5	Ein MHC Kl. I-Molekül, polymorphe AS sind farbig markiert. . .	17
1.6	Ein MHC Kl. I-Molekül komplexiert mit CD8.	17
1.7	Ein MHC Kl. II-Molekül.	18
1.8	Ein TCR, die CDRs sind farbig hervorgehoben.	23
1.9	Die Bindung des TCRs an pMHC.	24
1.10	Schematische Darstellung der TCR/pMHC-Kontaktfläche.	25
3.1	Der Prozentsatz V α 8.2-positiver CD8-Zellen in der LEW.1F-, der LEW- und der DA-Ratte.	60
3.2	Überselektion von V α 8.2-T-Zellen durch RT1 ^f	61
3.3	Prozentsatz an AV8S2 ⁺ -CD8-Zellen in der Alloerkennung von RT1 ^a bzw. RT1 ^f	62
3.4	Präferentielle Expansion von V α 8.2-positiven CD8-T-Zellen bei der Alloerkennung von RT1 ^f	63
3.5	Klonierungsstrategie.	65
3.6	Nukleotidsequenz von A ^f von Exon 2 bis zum Stopcodon.	67
3.7	Aminosäuresequenz von A ^f von Exon 2 bis zum Stopcodon. . . .	67
3.8	Nukleotidsequenz von A2 ^f von Exon 2 bis zum Stopcodon.	68
3.9	Aminosäuresequenz von A2 ^f von Exon 2 bis zum Stopcodon. . .	68
3.10	Homologie von MHC Kl. I-Sequenzen verschiedener Ratte-Haplotypen.	69
3.11	Umklonierung in pLEN.	70
3.12	Ratte-MHC Kl. I-Expression der transfizierten L-Zellen.	73
3.13	Erkennung der Kl. I-transfizierten L-Zellen durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.	73

3.14	Erkennung der Kl. I-transfizierten L-Zellen durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest. Restimulation und Blockade der Maus-MHC Kl. I-Moleküle.	74
3.15	Expression von endogenen Maus- und Ratte-MHC Kl. I-Molekülen des T-Zellhybridoms 35/1.	75
3.16	Erkennung der Kl. I-transfizierten T-Zellhybridome durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.	76
3.17	Erkennung der Kl. I-transfizierten P815-rCD80 Maus-Mastzellen durch LEW.1F-aktivierte Effektoren in einem Zytotoxizitätstest.	76
3.18	A^f -Expression der A^f -infizierten RMA-S-Zellen bei 27 °C bzw. 37 °C.	78
3.19	Stabilisierung der A^f -Expression auf RMA-S-Zellen durch Peptid.	79
3.20	Erkennung von Kl. I-transfizierten THOs durch $V\alpha 8.2^+$ - bzw. $V\alpha 8.2^-$ -Effektoren.	83
3.21	MLR mit Ratte-MHC-I-transfizierten L-Zellen als Stimulatoren.	85
3.22	MLR mit Ratte-Kl. I-infizierten LEW-THOs als Stimulatoren.	87
3.23	Ratte-CD80, bzw. Ratte-MHC-I-Expression der Ratte-MHC Kl. I-infizierten P815-rCD80 Klone.	90
3.24	MLR von LEW-LN-T-Zellen gegen Ratte-Kl. I-transfizierte P815-rCD80-Zellen (Blasten, Versuch P6).	92
3.25	MLR von LEW -LN-T-Zellen gegen Ratte-Kl. I-transfizierte P815-rCD80-Zellen (Kleine Zellen, Versuch P6).	92
3.26	RT1. A^f : Unterschiede zu A^a und TCR-Kontaktpunkte.	95
3.27	Schema der Konstruktion der Hybridmoleküle.	97
3.28	Klonierung der Hybridmoleküle.	98
3.29	Erkennung der Kl. I-Hybrid-transfizierten L-Zellen in einem Zytotoxizitätstest mit RT1 f -reaktiven Effektoren.	101
3.30	Ratte-MHC-I- und CD80-Expression der Hybridmolekül-exprimierenden P815-rCD80-Zellen.	102
3.31	Kartierung der $A^f/V\alpha 8.2$ -Interaktion (Blasten, P7).	104
3.32	Kartierung der $A^f/V\alpha 8.2$ -Interaktion (Kleine Zellen, P7).	104
4.1	Kontakte der α -Ketten CDR-Schleifen zum MHC.	120

Tabellenverzeichnis

3.1	Charakterisierung der Ratte Kl. I-Transfektanten mit Alloantikörpern.	71
3.2	Tabelle der MLRs mit L-Stimulatorzellen.	86
3.3	Tabelle der MLRs mit T-Zellhybridomen als Stimulatorzellen.	88
3.4	Tabelle der MLRs mit P815-rCD80 Stimulatorzellen.	91
3.5	Eine Auflistung der Aminosäuren, die A ^a von A ^f extrazellulär unterscheiden.	94
3.6	Tabelle zur Unterscheidung der Hybridmoleküle von den Ausgangsprodukten.	98
3.7	Charakterisierung der Hybrid-Transfektanten mit Alloantikörpern.	100
4.1	Kreuzreaktivität von Alloantikörpern, die durch RT1 ^a -Immunisierung generiert wurden, mit anderen Haplotypen.	109
4.2	Tabelle MHC-Positionen, die vom TCR kontaktiert werden.	111
4.3	Tabelle der MHC-Positionen, die die B- und F-Tasche aufbauen.	112
4.4	Die Anzahl der Kontakte der einzelnen CDRs des TCR zu MHC bzw. Peptid.	124
4.5	Auflistung der einzelnen Aminosäuren des MHC-gebundenen Peptids.	125

Literaturverzeichnis

- AMADOU, C., A. KUMANOVICS, E. JONES, D. LAMBRACHT-WASHINGTON, M. YOSHINO und K. FISCHER LINDAHL (1999). *The mouse major histocompatibility complex: some assembly required*. Immunological Reviews, 167:211–221.
- AMSEN, D. und A. KRUISBEEK (1998). *Thymocyte selection: not by TCR alone*. Immunological Reviews, 165:209–229.
- ARDEN, B. (1998). *Conserved motifs in T-cell receptor CDR1 and CDR2: implications for ligand and CD8 co-receptor binding*. Current Opinion in Immunology, 10:74–81.
- ASHMAN, L.K., G. KRIEK, S. COOPER und D. O'KEEFE (1987). *Requirements for the stimulation of allogeneic T lymphocytes by acute non-lymphoblastic leukemia cells*. Cancer Immunol Immunother, 25(3):250–256.
- BECK, S. und J. TROWSDALE (1999). *Sequence organisation of the class II region of the human MHC*. Immunological Reviews, 167:201–210.
- BJORKMAN, P.J. (1997). *MHC Restriction in Three Dimensions: A View of T Cell Receptor/Ligand Interactions*. Cell, 89:167–170.
- BRAUD, V.M., D. ALLAN und A. MCMICHAEL (1999). *Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules*. Current Opinion in Immunology, 11:100–108.
- BUEHLER, H. und R. MULLIGAN (1996). -. Molecular Medicine, 2:545–555.
- BUTCHER, G. (1987). *A list of monoclonal antibodies specific for alloantigens of the rat*. Journal of Immunogenetics, 14:163–176.
- BUUS, S. (1999). *Description and prediction of peptide-MHC binding: the human MHC project*. Current Opinion of Immunology, 11:209–213.

- CARRINGTON, M., G. NELSON, M. MARTIN, T. KISSNER, D. VLAHOV, J. GOEDERT, R. KASLOW, S. BUCHBINDER, K. HOOTS und S. O' BRIEN (1999). *HLA and HIV-1: Heterozygote Advantage and B*35-Cw*04 Disadvantages*. *Science*, 283:1784–1752.
- CHAPEROT, L., J. PLUMAS, M. JACOB, F. BOST, J. MOLENS, J. SOTTO und J. BEMSA (1999). *Functional expression of CD80 and CD86 allows immunogenicity of malignant B cells from non-Hodgkin's lymphomas*. *Exp Hematol*, 27(3):479–488.
- CHAPMAN, H.A. (1998). *Endosomal proteolysis and MHC class II function*. *Current Opinion in Immunology*, 10:93–102.
- COLLINS, E.J. und J. A. FREILINGER (1998). *Altered peptide ligand design: altering immune responses to class I MHC/peptide complexes*. *Immunological Reviews*, 163:151–160.
- COLLINS, E.J., D. GARBOCZI und D. WILEY (1994). *Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site*. *Nature*, 371:626–629.
- CONSORTIUM, THE MHC SEQUENCING (1999). *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex*. *Nature*, 401:921–925.
- DANIEL, C., S. HORVATH und P. ALLEN (1998). *A Basis for Alloreactivity: MHC Helical Residues Broaden Peptide Recognition by the TCR*. *Immunity*, 8:543–552.
- DING, Y., B. BAKER, D. GRBOCZI, W. BIDDISON und D. WILEY (1999). *Four A6-TCR/Peptide/HLA-A2 Structures that Generate Very Different T Cell Signals Are Nearly Identical*. *Immunity*, 11:45–56.
- DING, Y., K. SMITH, D. GARBOCZI, U. UTZ, W. BIDDISON und D. WILEY (1998). *Two Human T Cell Receptors Bind in a Similar Diagonal Mode to the HLA-A2/Tax Peptide Complex Using Different TCR Amino Acids*. *Immunity*, 8:403–411.
- ERNST, B., D. LEE, J. CHANG, J. SPRENT und C. SURH (1999). *The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery*. *Immunity*, 11:173–181.
- FIELDS, B.A., B. OBER, E. MALCHIODI, M. LEBEDEVA, B. C. BRADEN, X. YSERN, J. KIM, X. SHAO, E. S. WARD und R. MARIUZZA (1995). *Crystal Structure of the V α Domain of a T Cell Antigen Receptor*. *Science*, 270:1821–1824.
-

- FREILINGER, J.A. und M. MCMILLAN (1996). *The Role of Peptide Specificity in MHC Class I-Restricted Allogeneic Responses*. Immunological Reviews, 154:45–58.
- FREMONT, D.H., E. STURA, M. MATSUMURA, P. PETERSON und I. WILSON (1992). *Crystal structure of an H-2K^b-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove*. PNAS USA, 92:2479–2483.
- FUKUI, Y., O. HASHIMOTO, A. INAYOSHI, T. GYOTOKU, T. SANO, T. KOGA, T. GUSHIMA und T. SASAZUKI (1998). *Highly Restricted T Cell Repertoire Shaped by a Single Major Histocompatibility Complex-Peptide Ligand in the Presence of a Single Rearranged T Cell Receptor β Chain*. Journal of Experimental Medicine, 188(5):897–907.
- FUKUMOTO, T., W. MCMASTER und A. WILLIAMS (1982). *Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus*. European Journal of Immunology, 12(3):237–243.
- GAO, G.F., J. TORMO, U. GERTH, J. WYER, A. MCMICHAEL, D. STUART, J. I. BELL, E. JONES und B. JAKOBSEN (1997). *Crystal structure of the complex between human CD8 α (α) and HLA-A2*. Nature, 387:630–634.
- GARBOCZI, D.N. und W. BIDDISON (1999). *Shapes of MHC Restriction*. Immunity, 10:1–7.
- GARBOCZI, D.N., P. GHOSH, U. UTZ, Q. FAN, W. BIDDISON und D. WILEY (1996). *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. Nature, 384:134–141.
- GARCIA, K.C., M. DEGANO, L. PEASE, M. HUANG, P. A. PETERSON, L. TEYTON und I. WILSON (1998). *Structural Basis of Plasticity in T Cell Receptor Recognition of a Self Peptide-MHC Antigen*. Science, 279:1166–1172.
- GARCIA, K.C., M. DEGANO, R. STANFIELD, A. BRUNMARK, M. JACKSON, P. PETERSON, L. TEYTON und I. WILSON (1996). *An $\alpha\beta$ T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex*. Science, 274:209–219.
- GEUZE, H.J. (1998). *The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning*. Immunology Today, 19(6):282–287.
-

- GLITHERO, A., J. TORMO, J. HAURUM, G. ARSEQUELL, G. VALENCIA, J. EDWARDS, S. SPRINGER, A. TOWNSEND, Y. PAO, M. WORMALD, R. DWEK, E. JONES und T. ELLIOTT (1999). *Crystal structure of two H-2Db/glycopeptide complexes suggest a molecular basis for CTL cross-reactivity..* Immunity, 10:63–74.
- GRAKOU, A., S. BROMLEY, C. SUMEN, M. M. DAVIS, A. SHAW, P. ALLEN und M. L. DUSTIN (1999). *The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation.* Science, 285:221–227.
- GÜNTHER, E. (1996). *Current status of the molecular genetic analysis of the rat major histocompatibility complex.* Folia biologica praha, 42(4):129–145.
- HANAHAN, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J. Mol. Biol., 144(6):557–580.
- HEATH, W.R. und F. CARBONE (1999). *Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming.* Current Opinion in Immunology, 11:314–318.
- HILL, A.V.S (1999). *Defence by diversity.* Nature, 398:668–669.
- HUGHES, A.L., M. YEAGER, A. TEN ELSHOF und M. CHORNEY (1999). *A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules.* Immunology Today, 20(1):22–26.
- HÜNIG, T. (1985). *The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. Identification and partial characterization using a monoclonal antibody..* Journal of Experimental Medicine, 162(3):890–901.
- HÜNIG, T., H. WALLNY, J. HARTLEY, A. LAWETZKY und G. TIEFENTHALER (1989). *A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes..* Journal of experimental medicine, 169(1):73–86.
- IEZZI, G., K. KARJALAINEN und A. LANZAVECCHIA (1998). *The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naive and Effector T Cells.* Immunity, 8:89–95.
- JAMESON, S.C. und M. BEVAN (1998). *T-cell selection.* Current Opinion of Immunology, 10:214–219.
- JOLY, E., C. CLARKSON, J. HOWARD und G. BUTCHER (1995). *Isolation of a functional cDNA encoding the RT1.A^u MHC class I heavy chain by a novel PCR-based method.* Immunogenetics, 41:326–328.
-

- JOLY, E., E. DEVERSON, J. COADWELL, E. GÜNTHER, J. HOWARD und G. BUTCHER (1994). *The distribution of Tap2 alleles among laboratory rat RT1 haplotypes*. Immunogenetics, 40:45–53.
- JOLY, E., A. LE ROLLE, A. GONZALEZ, B. MEHLING, J. STEVENS, W. COADWELL, T. HÜNIG, J. HOWARD und G. BUTCHER (1998). *Co-evolution of rat TAP transporters and MHC class I RT1-A molecules*. Current Biology, 8(3):169–172.
- JOLY, E., L. LEONG, W. COADWELL, C. CLARKSON und G. BUTCHER (1996). *The Rat MHC Haplotype RT1c Expresses Two Classical Class I Molecules*. The Journal of Immunology, 157:1551–1558.
- JOLY, E. und M. OLDSTONE (1991a). *Generation of a functional cDNA encoding the L^d class-I molecule by using a single-LTR retroviral shuttle vector*. Gene, 97:213–221.
- JOLY, E. und M. OLDSTONE (1991b). *Manufacture of a functional cDNA for the H-2D^b molecule using a retroviral shuttle vector*. Immunogenetics, 34:62–65.
- JOYCE, S. und S. NATHENSON (1996). *Alloreactivity, Antigen Recognition and T-Cell Selection: Three Diverse T-Cell Recognition Problems with a Common Solution*. Immunological Reviews, 154:59–103.
- KASAHARA, M. (1999). *The chromosomal duplication model of the major histocompatibility complex*. Immunological Reviews, 167:17–32.
- KERN, P.S., M. TENG, A. SMOLYAR, J. LIU, R. HUSSEY, R. SPOER., H. CHANG, E. REINHERZ und J. WANG (1998). *Structural basis of CD8 coreceptor function revealed by crystallographic analysis of a murine CD8alpha₁ ectodomain fragment in complex with H-2Kb*. Immunity, 9:519–530.
- KERSH, G.J., E. KERSH, D. FREMONT und P. ALLEN (1998). *High- and Low-Potency Ligands with Similar Affinities for the TCR: The Importance of Kinetics in TCR Signaling*. Immunity, 9:817–826.
- KIMURA, H. und D. WILSON (1984). *Anti-idiotypic cytotoxic T cells in rats with graft-versus-host disease*. Nature, 308:463–464.
- LANE, P.J.L. und T. BROCKER (1999). *Developmental regulation of dendritic cell function*. Current Opinion in Immunology, 11:308–313.
-

- LEWIS, J.W. und T. ELLIOTT (1998). *Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly*. *Current Biology*, 8(12):717–720.
- LI, S., T. SATOH, R. KORNGOLD und Z. HUANG (1998). *CD4 dimerization and oligomerization: implications for T-cell function and structure-based drug design*. *Immunology Today*, 19:455–461.
- LIVINGSTONE, A.M., S. POWIS, E. GÜNTER, D. CRAMER, J. HOWARD und G. BUTCHER (1991). *Cim: an MHC class II-linked allelism affecting the antigenicity of a classical class I molecule for T lymphocytes*. *Immunogenetics*, 34:157–163.
- LORD, G.M., R. LECHLER und A. GEORGE (1999). *A kinetic differentiation model for the action of altered TCR ligands*. *Immunology Today*, 20(1):33–39.
- MADDEN, D.R. (1995). *The Three-Dimensional Structure of Peptide-MHC Complexes*. *Annual Review of Immunology*, 13:587–622.
- MAEDA, K., T. SATO, M. AZUMA, H. YAGITA und K. OKUMURA (1997). *Characterization of rat CD80 and CD86 by molecular cloning and mAb*. *International Immunology*, 9(7):993–1000.
- MANNING, T.C., C. SCHLUETER, T. BRODNICKI, E. PARKE, J. SPEIR, K. GARCIA, L. TEYTON, I. WILSON und D. KRANZ (1998). *Alanine Scanning Mutagenesis of an $\alpha\beta$ T Cell Receptor: Mapping the Energy of Antigen Recognition*. *Immunity*, 8:413–425.
- MASON, D. (1998). *A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor*. *Immunology Today*, 19(9):395–404.
- MATSUMURA, M., D. FREMONT, P. PETERSON und I. WILSON (1992). *Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules*. *Science*, 257:927–934.
- MERKENSCHLAGER, M., D. GRAF, M. LOVATT, U. BOMMARDT, R. ZAMOYSKA und A. FISHER (1997). *How many thymocytes audition for selection?*. *Journal of Experimental Medicine*, 186:1149–1158.
- MONKS, C.R., B. FREIBERG, H. KUPFER, N. SCIAKY und A. KUPFER (1998). *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. *Nature*, 395:82–86.
-

- NAKATSUJI, T., H. INOKO, A. ANDO, T. SATO, Y. KOIDE, T. TADAKUMA, T. YOSHIDA und K. TSUJI (1987). *The role of transfected HLA-DQ genes in the mixed lymphocyte reaction-like condition*. Immunogenetics, 25(1):1–6.
- PARHAM, P (1999). *Virtual reality in the MHC*. Immunological Reviews, 167:5–15.
- PARK, J. H., H. T. und T. HÜNIG (1996). *Identification and cellular distribution of the rat interleukin-2 receptor β chain: induction of the $IL-2R\alpha^{-}\beta^{+}$ phenotype by major histocompatibility complex class I recognition during T cell development in vivo and by T cell receptor stimulation of $CD4^{+}8^{+}$ immature thymocytes in vitro*. European Journal of Immunology, 26:2371–2375.
- POTTS, W.K. und P. SLEV (1995). *Pathogen-based models favoring MHC genetic diversity*. Immunological Reviews, 143:181–197.
- POWIS, S.J., A. TOWNSEND, E. DEVERSON, J. BASTIN, G. BUTCHER und J. HOWARD (1991). *Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter*. Nature, 354:528–531.
- POWIS, S.J., L. YOUNG, E. JOLY, P. BARKER, L. RICHARDSON, R. BRANDT, C. MELIEF, J. HOWARD und G. BUTCHER (1996). *The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER*. Immunity, 4:159–165.
- RACHED, L.A. und P. MCDERMOTT, M.F. AD PONTAROTTI (1999). *The MHC big bang*. Immunological Reviews, 167:33–45.
- RATTIS, F.M., M. CONCHA, C. DALBIEZ-GAUTHIER, P. COURTELLEMONT, D. SCHMITT und J. PEGUET-NAVARRO (1998). *Effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cells: functional alteration of CD86 upregulation and induction of apoptotic cell death*. J. Invest. Dermatol., 111(3):373–379.
- REINHERZ, E.L., K. TAN, L. TANG, P. KERN, J. LIU, Y. XIONG, R. HUSSEY, A. SMOLYAR, B. HARE, R. ZHANG, A. JOACHIMIAK, H. CHANG, G. WAGNER und J. WANG (1999). *The Crystal Structure of a T Cell Receptor in Complex with Peptide and MHC Class II*. Science, 286:1913–1921.
- REIZIS, B., H. SCHILD, S. STEFANOVIC, F. MOR, H. RAMMENSEE und I. COHEN (1997). *Peptide binding motifs of the MHC class I molecules (RT1.A1) of the Lewis rat*. Immunogenetics, 45:278–279.
-

- ROCK, E.P., P. SIBBALD, M. DAVIS und Y. CHIEN (1994). *CDR3 Length in Antigen-specific Immune Receptors*. *Journal of Experimental Medicine*, 179:323–328.
- ROITT, I. (1994). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, 8. Aufl.
- SCHOENBERGER, S.P., R. TOES, E. VAN DER VOORT, R. OFFRINGA und C. MELIEF (1998). *T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*. *Nature*, 393:480–483.
- SCHUMACHER, T.N. (1999). *Immunology. Accessory to murder*. *Nature*, 398:77–80.
- SCOTT, C.A., P. PETERSON, L. TEYTON und I. WILSON (1998). *Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues*. *Immunity*, 8(3):319–329.
- SEBZDA, E., S. MARIATHASAN, T. OHTEKI, T. JONES, M. BACHMANN und P. OHASHI (1999). *Selection of the T Cell Repertoire*. *Annual Review of Immunology*, 17:829–874.
- SHIINA, T., G. TAMIYA, A. OKA, N. TAKISHIMA und H. INOKO (1999). *Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region*. *Immunological Reviews*, 167:193–199.
- SIM, B., D. LO und N. GASCOIGNE (1998a). *Preferential expression of TCR V α regions in CD4/CD8 subsets: class discrimination or co-receptor recognition?* *Immunology Today*, 19(6):276–281.
- SIM, B., P. TRAVERS und N. GASCOIGNE (1997). *V α 3.2 Selection in MHC Class I Mutant Mice*. *The Journal of Immunology*, 159:3322–3329.
- SIM, B., J. WUNG und N. GASCOIGNE (1998b). *Polymorphism within a TCRAV Family Influences the Repertoire Through Class I/II Restriction*. *The Journal of Immunology*, 160:1204–1211.
- SIM, B., L. ZERVA, M. GREENE und N. GASCOIGNE (1996). *Control of MHC Restriction by TCR V α CDR1 and CDR2*. *Science*, 273:963–966.
- SIMMONS, W.A., L. LEONG, N. SATUMTIRA, G. BUTCHER, J. HOWARD, J. RICHARDSON, C. SLAUGHTER, R. HAMMER und J. TAUROG (1996). *Rat MHC-Linked Peptide Transporter Alleles Strongly Influence Peptide Binding by HLA-B27 but Not B27-Associated Inflammator Disease*. *The Journal of Immunology*, 156:1661–1667.
-

- SIMPSON, E. und D. ROOPENIAN (1997). *Minor histocompatibility antigens*. Current Opinion in Immunology, 9(5):655–661.
- SMITH, K.D. und C. LUTZ (1997). *Alloreactive T cell recognition of MHC class I molecules: the T cell receptor interacts with limited regions of the MHC class I long alpha helices*. Journal of Immunology, 158(6):2805–2812.
- SPEIR, J.A., K. GARCIA, A. BRUNMARK, M. DEGANO, P. PETERSON, L. TEYTON und I. WILSON (1998). *Structural Basis of 2C TCR Allorecognition of H-2L^d Peptide Complexes*. Immunity, 8:553–562.
- STEVENS, J., K. WIESMÜLLER, P. WALDEN und E. JOLY (1998). *Peptide length preferences for rat and mouse MHC class I molecules using random peptide libraries*. European Journal of Immunology, 28:1272–1279.
- TACKE, M., G. CLARK, M. DALLMAN und T. HÜNIG (1995). *Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester.* Journal of Immunology, 154(10):5121–5127.
- TANCHOT, C., F. LEMONNIER, B. PERARNAU, A. A. FREITAS und B. TOCHA (1997). *Differential Requirements for Survival and Proliferation of CD8 Naive or Memory T Cells*. Science, 276:2057–2062.
- THORPE, C.J., D. MOSS, S. POWIS, J. HOWARD, G. BUTCHER und P. TRAVERS (1995). *An analysis of the antigen binding site of RT1.Aa suggests an allele-specific motif*. Immunogenetics, 41:329–331.
- TORRES-NAGEL, N., A. DEUTSCHLÄNDER, T. HERRMANN, B. ARDEN und T. HÜNIG (1997). *Control of TCRV α -mediated positive repertoire selection and alloreactivity by differential J α usage and CDR3 α composition*. International Immunology, 9(10):1441–1452.
- TORRES-NAGEL, N., T. HERRMANN und T. HÜNIG (1998). *Handbook of Vertebrate Immunology/Rat section/The rat T-cell receptor*. Academic Press Limited. ISBN: 0-12-546401-0.
- TORRES-NAGEL, N.E., T. HERRMANN, G. GIEGERICH, K. WONIGEIT und T. HÜNIG (1994). *Preferential TCR V usage in rat repertoire selection: V α 8 imparts both positive thymic selection by and alloreactivity to RT1^f*. International Immunology, 6(9):1367–1373.
-

- TOWNSEND, A., C. ÖHLEN, J. BASTIN, H. LJUNGGREN, L. FOSTER und K. KÄRRE (1989). *Associtation of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides*. *Nature*, 340:443–448.
- TURNER, S.J., S. JAMESON und F. CARBONE (1997). *Functional Mapping of the Orientation for TCR Recognition of an H2-K^b-Restricted Ovalbumine Peptide Suggests That the β -Chain Subunit Can Dominate the Determination of Peptide Side Chain Specificity*. *The Journal of Immunology*, 159:2312–2317.
- VIRET, C., S. WONG und C. JANEWAY (1999). *Designing and Maintaining the Nature TCR Repertoire: the Continuum of Self-Peptide:Self-MHC Complex Recognition*. *Immunity*, 11:559–568.
- VON BOEHMER, H., I. AIFANTIS, J. FEINBERG, O. LECHNER, C. SAINT-RUF, U. WALTER, J. BUER und O. AZOGUI (1999). *Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor*. *Current Opinion in Immunology*, 11:135–142.
- WANG, F., T. ONO, A. KALERGIS, W. ZHANG, T. DILORENZO, K. LIM und G. NATHENSON (1998). *On defining the rules for interactions between the T cell receptor and its ligand: A critical role for a specific amino acid residue of the T cell receptor β chain*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5217–5222.
- WANG, M., S. STEPKOWSKI, L. TIAN, J. LANGOWSKI, J. YU und B. KAHAN (1996). *Nucleotide sequences of three distinct clones coding for rat heavy chain class I major histocompatibility antigens*. *Immunogenetics*, 43:318–320.
- WATTS, C. (1997). *Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules*. *Annual Review of Immunology*, 15:821–850.
- WILLCOX, B.E., G. GAO, J. WYER, J. LADBURY, J. BELL, B. JAKOBSEN und P. VAN DER MERWE (1999). *TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface*. *Immunity*, 10:357–365.
- WILSON, I.A. und B. P.J. (1998). *Unusual MHC-like molecules: CD1, Fc receptor, the hemochromatosis gene product, and viral homologs*. *Current Opinion in Immunology*, 10:67–73.
- WITTE, T., A. SMOLYAR, R. SPOERL, E. GOYARTS, S. NATHENSON, E. REINHERZ und H. CHANG (1997). *Major histocompatibility complex recognition by immune receptors: differences among T cell receptor versus antibody interactions with VSV8/H-2K_b complex*. *European Journal of Immunology*, 27(1):227–233.
-

-
- WU, H., P. KWONG und W. HENDRICKSON (1997). *Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4*. *Nature*, 387:527–530.
- XAVIER, R. und B. SEED (1999). *Membrane compartmentation and the response to antigen*. *Current Opinion of Immunology*, 11:265–269.
- YEAGER, M. und A. HUGHES (1999). *Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination and convergent evolution*. *Immunological Reviews*, 167:45–58.
- YORK, I.A. und K. ROCK (1996). *Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex*. *Annual Review of Immunology*, 14:369–396.
- ZERRAHN, J., W. HELD und D. RAULET (1997). *The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection*. *Cell*, 88:627–636.
- ZINKERNAGEL, R.M. und P. DOHERTY (1974). *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system*. *Nature*, 248:701–702.
-

Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
“	Sekunde
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Ag	Antigen
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BC	B-Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
β_2m	β_2 -Mikroglobulin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	Differenzierungsantigen (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementaritäts-bestimmende Region (engl.: complementarity determining region)
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (engl. cytotoxic T lymphocyte)
d	Tag
d α m	Esel-anti-Maus
d α r	Esel-anti-Ratte
DC	Dendritische Zelle
DN	Doppelnegativer Thymozyt (engl. double negative)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DP	Doppelpositiver Thymozyt (engl. double positive)
engl.	englisch
evtl.	eventuell
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortier/aufnahmeeinrichtung (engl. fluorescence activated cell sorter/scanner)
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreuung (engl. forward scatter)
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
ISP	Unreifer einfachpositiver Thymozyt (engl. immature SP)

Kap.	Kapitel
Kl. I	Klasse I
LN	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: major histocompatibility complex)
MLC	Kultur gemischter Lymphozyten (engl. mixed lymphocyte culture)
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (engl. mixed lymphocyte reaction)
MW	Mittelwert
NMIg	Normales Mausimmunglobulin
NW	Nylonwollsäule
P80	Mausmastzelllinie P815-rCD80
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
pMHC	Peptid/MHC
RIgG	Ratten-Immunglobulin G
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannter/e/es
SP	Einfachpositiver Thymozyt (single positive)
SSC	Seitwärtsstreuung (engl. side scatter)
Std	Standardabweichung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAP	Peptidtransporter (engl.: transporter associated with antigen processing)
Tc	zytotoxische T-Zelle (engl. cytotoxic T-cell)
TC	T-Zelle (engl. T-cell)
TCR	T-Zellrezeptor (engl. T-cell receptor)
Th	T-Helferzelle
THO	T-Zell-Hybridom
u.a.	unter anderem
ugf.	ungefähr
ÜS	Überstand
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

Lebenslauf

Name	Beatrix Elisabeth Mehling
Geburtsdatum	18.05.1971, München
Eltern	Dr. Marianne Mehling, geb. Wünzer Franz Nikolaus Mehling
Grundschule	1977-1981, Groebenschule, Garmisch-Partenkirchen
Gymnasium	1981-1990, St. Irmengard-Schule, Garmisch-Partenkirchen
Abitur	29.06.1990, Gesamtnote 1,4
Studium	Biologie seit 1990, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Diplomarbeit	1994-1995 bei Prof. Dr. Holger Höhn, Institut für Humangenetik, Medizinische Fakultät Titel: Sauerstoff- und Mitomycin-C-induzierte Mutationsspektren in der Fanconi-Anämie
Diplom	10.10.1995, in den Fächern Genetik (Hauptfach), Biochemie, Zoologie (Tierphysiologie) Gesamtnote 1
Dissertation	seit Dezember 1995 bei Prof. Dr. Thomas Hünig, Institut für Virologie und Immunbiologie, Medizinische Fakultät
Forschungsaufenthalt	Januar-April 1996, Laboratory of Immunogenetics, Immunology Department, Babraham, Cambridge, UK

Publikationsliste

Originalarbeiten

Liebetrau, W., Runger, T.M., Mehling, B.E. Hoehn, H. (1997) Mutagenic activity of ambient oxygen and mitomycin C in Fanconi's anaemia cells. *Mutagenesis*, 12(2):69-77

Joly, E., LeRolle, A.F., Gonzalez, A.L., Mehling, B. Stevens, J., Coadwell, W.J., Hünig, T., Howard, J.C., Butcher, G.W. (1998) Co-evolution of rat TAP transporters and MHC class I RT1-A molecules. *Current Biology*, 8(3):169-172

Vorträge und veröffentlichte Abstracts

Mehling, B., Torres-Nagel, N., Deutschländer, A., Joly, E., Herrmann, T., Hünig, T. (1997) A novel rat MHC class I molecule driving allorecognition of V α 8.2⁺ CD8 cells. 28th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie

Torres-Nagel, N., Mehling, B., Deutschländer, A., Joly, E., Herrmann, T., Hünig, T. (1997) Structural requirements for T cell receptor Va mediated positive repertoire selection by and alloreactivity to MHC class I. 13th European Immunology Meeting

Joly, E., Stevens, J., LeRolle, A.F., Gonzalez, A.L., Mehling, B., Clarkson, C., Howard, J.C., Butcher, G.W. (1997) Co-evolution of rat Tap transporters and MHC class I RT1.A molecules. 13th European Immunology Meeting

Danksagung

Bei Prof. Dr. Hünig möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit als Doktorvater bedanken. Sie waren immer fair und haben mein Projekt trotz entnervender Fehlschläge nicht aufgegeben, sondern sich darum bemüht, es dennoch zum Erfolg werden zu lassen. Danke.

Herrn Prof. Dr. Heisenberg danke ich, da er sich als Vertreter der Biologischen Fakultät für die Betreuung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt und soviel Interesse investiert hat.

Die Babraham-Crew kannte ich vor der Würzburger-Clique. Trotz Kaff-Charakters (zwei Briefkästen und ein Pub) war die dortige Multi-kulti-Luft ziemlich an- und aufregend. Ich möchte mich bei den Bewohnern des Uni-Viertels (allen voran Saskia und Maritza) für das viele Lachen bedanken, bei den Leuten in meinem Labor (Andrea, Anne-France, Michael und James) für die Französisch-Deutsch-Spanischen-Diskussionen (einen "echten" Engländer bekamen wir erst zu Ende meiner Anwesenheit dort) und bei meinem dortigen Betreuer Dr. Etienne Joly für die wirklich profunde Ausbildung.

Dem gesamten Würzburger-Immunologen-Team möchte ich vor allem für seine Menschlichkeit und Wärme danken. Ich war gerne bei Euch! Nora möchte ich für das Kopfwaschen und für die "Brainstormings" im kalten Treppenhaus hinter Schimpl's danken, wo wir akute Notfälle behandelten. Bei Beate möchte ich mich bedanken, daß sie 318 nie im Chaos hat aufgehen lassen.

Meinen MitstreiterInnen Martina, Astrid, Marta, Chia-Huey und Frank, obwohl er natürlich eigentlich zu TH3 und nicht TH1 gehört, möchte ich für die zahlreichen (auch wissenschaftlichen) Diskussionen (Frühstücksseminar!), aber v.a. für die Freundschaft danken.

Den größten Dank schulde ich meiner Familie und meinem Freund Andreas: nicht nur aufgrund der unzähligen Stunden, die Ihr für mich – neben Eurem anstrengendem Alltag – reserviert habt, sondern v.a. wegen der Liebe, die Ihr mir entgegengebracht habt. Ohne Euch wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen, und ich wäre jetzt anders.
