

Identifikation und Charakterisierung
von autoreaktiven humanen T-Zell-Rezeptor Molekülen

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

vorgelegt von

Sabine Seitz

aus Miltenberg

Würzburg 2007

Meinen Eltern

Eingereicht am: 13.02.2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 02.05.2007

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Summary	VI
Zusammenfassung	VII
I. Einleitung	1
1. Das menschliche Immunsystem	1
2. MHC-Moleküle	1
3. T-Zell-Rezeptor	4
3.1 Struktur des TZR	4
3.2 Rezeptordiversität	5
4. Der ternäre Komplex aus T-Zell-Rezeptor, Peptid und MHC-Molekül	7
4.1 Bindungsstudien	7
4.2 Affinität und Degeneration	8
5. Die Rolle von T-Lymphozyten in Autoimmunerkrankungen	10
6. Inflammatorische Myopathien und Multiple Sklerose	11
6.1 Inflammatorische Myopathien	11
6.2 Multiple Sklerose	12
7. Fragestellung	13
7.1 Analyse potentiell autoaggressiver T-Lymphozyten	13
7.2 Vorgehensweise zur Detektion und Analyse potentiell autoaggressiver T-Lymphozyten aus Gewebe	14
II. Material und Methoden	17
1. Material	17
1.1 Geräte	17
1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
1.3 Patientenmaterial	18
1.4 Bakterienstämme	19
1.5 Vektoren	19
1.6 Oligonukleotide	19
1.6.1 Primer für die Einzelzell-RT-PCR	19
1.6.1.1 RT-Primer	19

1.6.1.2	Primer für die Prä-Amplifikation	19
1.6.1.3	Klonspezifische Primer für die TZR- β -Ketten	20
1.6.1.4	Universelle Primer Sets für die TZR- α -Ketten	21
1.6.1.5	Klonspezifische Primer für die TZR- α -Ketten	22
1.6.2	Primer für die TZR-Klonierung	22
1.6.2.1	Klonierung der TZR des Patienten PM16488	22
1.6.2.2	Klonierung des TZR JM22	23
1.6.2.3	Primer für die Amplifikation der patientenspezifischen HLA-Moleküle	23
1.7	Antikörper	24
1.7.1	Primäre und direkt gekoppelte Antikörper	24
1.7.2	Sekundäre Antikörper	24
1.8	Eukaryotische Zellen	25
1.9	Allgemeine Puffer und Lösungen	25
1.10	Zellkultur-Reagenzien	26
1.11	Kits und spezielle Reagenzien	26
2.	Molekularbiologische Methoden	27
2.1	Anzucht von Bakterienkulturen	27
2.1.1	Bakterienwachstum auf Agarplatten	27
2.1.2	Vermehrung von Bakterien über Flüssigkulturen	27
2.1.3	Konservierung von Bakterienstämmen	28
2.2	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	28
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation	28
2.2.2	Elektroporation	29
2.3	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	29
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	29
2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke	30
2.3.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	31
2.4	Präzipitation von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	31
2.4.1	Präzipitation durch Pellet Paint	31
2.4.2	Präzipitation durch Natriumacetat / Ethanol	31
2.5	Gesamt-RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung aus eukaryotischen Zellen	32
2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	32
2.5.2	Erststrang cDNA-Synthese durch reverse Transkription von mRNA	32

2.6	Gelelektrophoretische Analyse von DNA	33
2.6.1	Analyse von DNA in Agarosegelen	33
2.6.2	DNA-Größenstandards	34
2.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.6.4	Reinigung von DNA-Fragmenten	34
2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.7.1	Amplifizierung von DNA-Sequenzen über PCR	35
2.7.2	In-vitro-Mutagenese über PCR	36
2.7.3	Einzelzell-RT-PCR	36
2.8	Klonierung	38
2.8.1	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.8.2	Ligation von DNA-Molekülen	39
2.9	Sequenzierung	40
2.10	CDR3-Spectratyping	41
3.	Isolation von Einzelzellen aus Gefrierschnitten	43
3.1	Anfertigen von Gefrierschnitten	43
3.2	Aufbringen von Zellen auf Objektträger mittels Cytospin	43
3.3	Immunhistologie	44
3.3.1	Alkalische Phosphatase Färbung (AP-Färbung)	44
3.3.2	Immunfluoreszenz-Färbung	44
3.4	Lasermikrodissektion	46
4.	Zellbiologische Methoden	46
4.1	Kultivierung von Suspensionszellen	46
4.2	Kultivierung von adhären wachsenden Zellen	47
4.3	Bestimmung der Zellzahl	47
4.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
4.5	Transfektion von Zellen	48
4.5.1	Transfektion von Zellen durch Elektroporation	48
4.5.2	Transfektion von Zellen mit Lipofectamin	49
4.5.3	Selektion der transfizierten Zellen	49
4.6	Transduktion von Zellen mit Hilfe von Retroviren	50
4.7	FACS-Analyse	50
4.8	Aktivierung der Transfektanten	51
4.8.1	Physiologische Aktivierung der Transfektanten	51

4.8.2	Spezifische Aktivierung der Transfektanten über MHC/Peptid-Komplexe	51
4.9	Positional Scanning-Combinatorial Peptide Libraries (PS-CPL)	52
4.10	Interleukin-2-ELISA	53
III.	Ergebnisse	54
1.	Detektion expandierter TZR- β -Ketten durch CDR3-Spectratyping	54
1.1	Expandierte TZR- β -Ketten des Patienten PM16488	55
1.2	Expandierte TZR- β -Ketten des Patienten IBM15551	56
1.3	Expandierte TZR- β -Ketten des MS-Patienten FE	57
2.	Isolierung expandierter Einzelzellen aus Blut, Muskel- und Hirngewebe	58
2.1	Färbung und Isolierung expandierter Einzelzellen aus Muskelgewebe der Myositispatienten PM16488 sowie IBM15551	59
2.1.1	Immunhistochemische Vorversuche auf Tonsillen- und Muskelgewebe	59
2.1.2	Isolierung expandierter $V\beta 1^+$ bzw. $V\beta 23^+$ Einzelzellen der Myositispatienten PM16488 bzw. IBM15551 durch Lasermikrodissektion	62
2.2	Färbung und Isolierung expandierter $V\beta 1^+$ Einzelzellen aus Blut und Hirngewebe des MS-Patienten FE	64
3.	Analyse isolierter Einzelzellen durch die Einzelzell-RT-PCR	65
3.1	Bestimmung der Effizienz der Einzelzell-RT-PCR	66
3.1.1	Effizienz für die Amplifikation eines TZR ungefärbter sowie gefärbter Zellen	67
3.1.2	Effizienz für die Amplifikation eines dualen TZR	69
3.2	Analyse der $V\beta 1^+$ Einzelzellen des Patienten PM16488	70
3.3	Analyse der $V\beta 23^+$ Einzelzellen des Patienten IBM15551	74
3.4	Analyse der $V\beta 1^+$ Einzelzellen des MS-Patienten FE	75
4.	Klonierung der rekombinanten TZR-Sequenzen des Patienten PM16488 in Expressionsvektoren	76
4.1	Klonierungsstrategie	76
4.2	Klonierung der TZR- $\alpha\beta$ -Ketten	76
4.2.1	Klonierung der $V\beta 1$ -TZR-Kette in den Vektor pRSV5neo	76
4.2.2	Klonierung der TZR- α -Ketten in den Vektor pRSV5hygro	78
5.	Expression der TZR- $\alpha\beta$ -Ketten im Maus-Hybridom 58 $\alpha\beta$	78

5.1	Cotransfektion der $\alpha\beta$ -Ketten	78
5.2	Charakterisierung der Transfektanten	79
5.2.1	Charakterisierung der Transfektanten mittels FACS-Analyse	79
5.2.2	Charakterisierung der Transfektanten durch Aktivierung mittels Antikörper	80
5.2.3	CD8-Transduktion der Transfektanten durch Retroviren	81
6.	TZR JM22 als Modell-System für die Antigensuche	81
6.1	Klonierung der TZR- $\alpha\beta$ -Kette und Expression im Maus-Hybridom 58 $\alpha\beta$	82
6.2	Ermittlung der Empfindlichkeit des TZR JM22 durch Peptidtitration	83
7.	Versuch der Aktivierung der Transfektanten durch ein muskelspezifisches Autoantigen oder ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen	84
7.1	Versuch der Aktivierung durch ein muskelspezifisches Autoantigen der menschlichen Rhabdomyosarkom Zelllinie TE671	84
7.1.1	Expression der HLA-Moleküle auf TE671-Zellen	85
7.1.1.1	Charakterisierung der HLA-A*02-Transfektanten mittels FACS-Analyse	85
7.1.1.2	Nachweis der HLA-Expression auf RNA-Ebene	86
7.1.2	Versuch der Aktivierung der TZR-Transfektanten durch HLA-exprimierende TE671-Zellen	86
7.2	Versuch der Aktivierung der TZR-Transfektanten durch ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen der autologen EBV-B-Zellen des Patienten PM16488	88
8.	Versuch der Identifizierung eines möglichen Antigens durch Positional Scanning-Combinatorial Peptid Libraries (PS-CPL)	89
8.1	PS-CPL-Versuch mit den TZR JM22 transfizierten Maus-Hybridomzellen	89
8.2	PS-CPL-Versuch mit den TZR 435 transfizierten Maus-Hybridomzellen	90
8.3	Antigensuche mittels modifizierter PS-CPL	91
IV.	Diskussion	93
V.	Literaturverzeichnis	103
VI.	Anhang	111
1.	Sequenzen der verwendeten TZR- α - und β -Ketten	111
2.	Abkürzungsverzeichnis	112

Summary

Multiple sclerosis and the inflammatory muscle diseases polymyositis and inclusion body myositis are autoimmune diseases. T cells invade and destroy brain tissue or muscle fibers, respectively. The pathogenesis of these diseases is still unknown.

The aim of this thesis was to isolate tissue invading autoaggressive T-lymphocytes from frozen biopsy specimens, to analyse their T cell receptor α - and β -chains and to express the receptors in a recombinant expression system. This may provide a tool to search for possible antigens.

To distinguish pathogenic from irrelevant bystander cells we used two criteria: the clonal expansion in the target tissue triggered by antigen induced proliferation and the direct morphological contact with a target cell. We analysed the T cell repertoire of different patients by CDR3-spectratyping to find clonal expanded populations and isolated immunohistochemically stained candidate cells by laser microdissection. Then we identified coexpressed pairs of α - and β -chains by a newly developed multiplex PCR protocol. The detection of matching α and β -chains in histological sections has not been achieved until now. The α -chain analysis has been a great problem because of the paucity of available α -chain antibodies and the great variability of the α -chain genes.

From the tissue of one patient we isolated 23 $\alpha\beta$ -T cell receptor pairs which expressed the same expanded T cell receptor β -chain. 20 of these 23 α -chains were identical, suggesting a pathogenic relevance of this T cell clone. The α -chains of the three other T cells were different. We characterized two further clones from another patient. The receptors from the first patient were expressed in a T hybridoma cell line. Initial studies to identify possible antigens revealed that the T cell receptors did not recognize a muscle specific antigen nor a widely expressed self-antigen.

This method for the analysis and reconstruction of tissue-infiltrating $\alpha\beta$ -T cells can be applied to many other autoimmune diseases as well as tumors or infectious diseases.

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose und die entzündlichen Muskelerkrankungen Polymyositis und Einschlusskörperchenmyositis sind Autoimmunerkrankungen, in denen T-Lymphozyten in das Gehirn bzw. den Muskel eindringen und dort körpereigenes Gewebe zerstören. Die Pathogenese dieser Krankheiten ist bis jetzt noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die ins Zielgewebe eingedrungenen autoaggressiven T-Lymphozyten aus gefrorenem Biopsiegewebe zu isolieren, ihren $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor zu analysieren und diesen rekombinant zu exprimieren. Folgeversuche mit den TZR-Transfektanten sollten erste Hinweise auf ein mögliches Antigen liefern.

Um autoaggressive T-Zellen von irrelevanten zu unterscheiden, konzentrierten wir uns auf Zellen, die zum einen im Zielgewebe klonal expandiert vorlagen, zum anderen einen direkten morphologischen Kontakt mit der Zielzelle aufwiesen. Wir untersuchten das T-Zell-Repertoire verschiedener Patienten auf klonal expandierte Populationen durch CDR3-Spektrotyping und isolierten positiv gefärbte Kandidatenzellen durch Lasermikrodissektion aus dem Gewebe. Anschließend wurden die T-Zell-Rezeptoren mit einer speziellen, im Rahmen der Arbeit entwickelten Einzelzell-Multiplex-RT-PCR analysiert. Bisher war es nicht möglich, die α - und β -Kette desselben T-Zell-Rezeptors aus Biopsiematerial zu identifizieren. Dies lag an der geringen Anzahl verfügbarer anti- α -Ketten-Antikörper sowie an der wesentlich höheren Variabilität der α -Ketten-Gene.

Aus dem Biopsiegewebe eines Patienten isolierten wir 23 $\alpha\beta$ -TZR-Pärchen, welche alle die identische expandierte TZR- β -Kette zeigten. 20 der 23 Zellen wiesen eine identische α -Kette auf. Die Dominanz des TZR ist ein Hinweis auf die pathogene Relevanz dieses T-Zell-Klons. Die anderen drei Zellen zeigten drei unterschiedliche funktionelle α -Ketten. Aus der Biopsie eines zweiten Patienten isolierten wir zwei weitere $\alpha\beta$ -TZR-Pärchen. Die vier Rezeptoren des ersten Patienten wurden in einer T-Zell Hybridom Zelllinie exprimiert. Vorläufige Versuche, ein mögliches Antigen zu detektieren, zeigten, dass es sich wahrscheinlich weder um ein muskelspezifisches Antigen noch um ein ubiquitär exprimiertes Selbst-Antigen handelt.

Die hier beschriebene Methode der Isolierung und Analyse von autoaggressiven T-Lymphozyten kann man nicht nur zur Untersuchung des TZR- $\alpha\beta$ -Repertoires von Myositis- oder MS-Patienten einsetzen. Sie ist ebenfalls geeignet, andere Autoimmunerkrankungen sowie Tumor- oder Infektionserkrankungen zu untersuchen.

I. Einleitung

1. Das menschliche Immunsystem

Die Hauptaufgabe des menschlichen Immunsystems besteht darin, ihn vor Mikroorganismen wie z.B. Bakterien, Pilze, Parasiten oder Viren zu schützen. Das komplexe, heterogene Zusammenspiel verschiedener Komponenten ermöglicht es, effektiv gegen eindringende Pathogene vorzugehen. Die Immunerkennung besitzt eine außergewöhnliche Diversität und Spezifität, sowie die Fähigkeit zwischen Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden.

Das Immunsystem besteht aus einer angeborenen sowie einer adaptiven, erworbenen Immunabwehr.

Die angeborene unspezifische Immunabwehr erfolgt humoral über das Komplementsystem und die damit verbundene zelluläre Aktivierung von Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen.

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich einerseits durch das spezifische und gezielte Vorgehen gegen Antigene (AG) sowie durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Es besteht aus einer humoralen und einer zellvermittelten Immunantwort.

Die humorale Immunantwort beruht auf der Produktion spezifischer Antikörper (AK) durch B-Lymphozyten und geht besonders gegen extrazelluläre Pathogene vor. Im Gegensatz dazu bekämpft die zellvermittelte Immunantwort v.a. intrazelluläre Pathogene. Die T-Lymphozyten erkennen das spezifische Antigen durch ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) auf der Zelloberfläche. Das Antigen wird in Form von Peptiden durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, kurz MHC) der Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) präsentiert. Die MHC-Moleküle wurden ursprünglich als Verursacher der Transplantatabstoßung entdeckt (Gorer et al., 1938).

2. MHC-Moleküle

Die MHC-Moleküle werden in MHC-Klasse I und MHC-Klasse II eingeteilt.

Die MHC-Klasse I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen somatischen Zellen exprimiert und präsentieren überwiegend cytosolische Peptide, die zuvor aus cytosolischen Proteinen durch das Proteasom zerlegt wurden. Diese Proteine können viralen Ursprungs sein bzw. missgefaltete oder fehlerhafte Proteinprodukte aus der Proteinbiosynthese, genannt DRiPs (defective ribosomal products) (zusammengefasst in Yewdell et al., 1996). Der TAP-Transporter (transporter associated with antigen processing) transportiert die Peptide in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Dort binden sie an neusynthetisierte MHC-Klasse

I-Moleküle. Die Peptid/MHC-Komplexe verlassen das Endoplasmatische Retikulum und gelangen über den Golgiapparat an die Zelloberfläche (Pamer und Cresswell; 1998; Rock und Goldberg; 1999). Dort werden sie durch T-Lymphozyten erkannt, welche auf ihrer Oberfläche den CD8-Corezeptor tragen. Die APZ wird dann durch die zytotoxische Reaktion mittels Effektorproteinen wie z.B. Perforin oder Granzym, die durch die T-Zelle ausgeschüttet werden, getötet (Townsend und Boder et al., 1989).

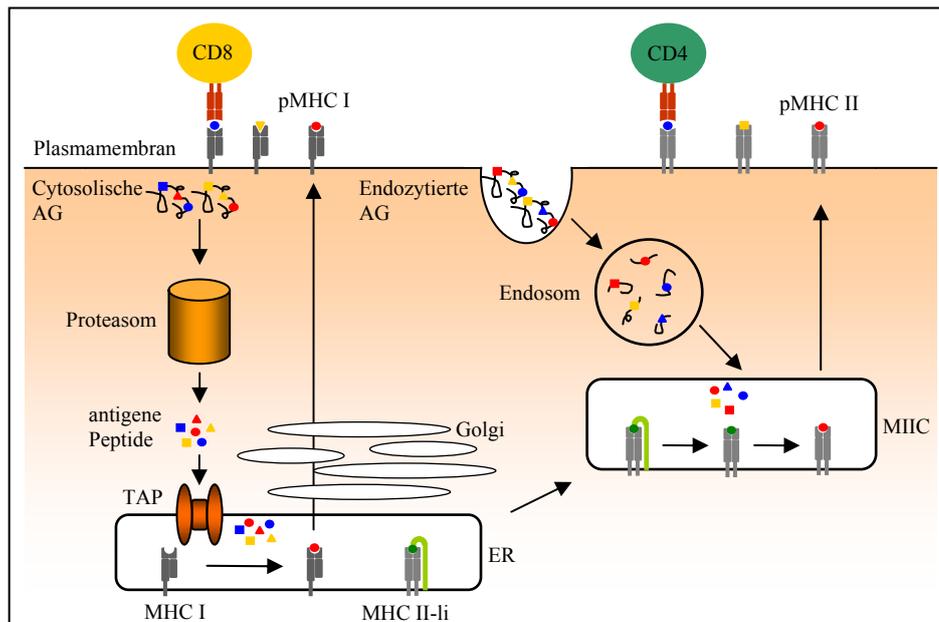


Abb. 1: MHC-I und MHC-II-Präsentationsweg

Beim MHC-I-Präsentationsweg (linke Hälfte) werden die cytosolischen AG durch das Proteasom in Peptidfragmente zerlegt. Diese binden im Endoplasmatischen Retikulum an MHC-I-Moleküle und werden anschließend auf der Zelloberfläche $CD8^+$ -T-Lymphozyten präsentiert.

Im MHC-II-Präsentationsweg (rechte Hälfte) erfolgt eine endozytotische Aufnahme extrazellulärer AG und der Transport über das Endosom in das MIIC-Kompartiment. Dort werden die im Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten MHC-II-Moleküle mit dem antigenen Peptid beladen und präsentieren diese den $CD4^+$ -T-Lymphozyten an der Zelloberfläche.

MHC-Klasse II-Moleküle werden auf sog. professionell Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. B-Lymphozyten, Makropagen, dendritischen Zellen sowie Endothelzellen exprimiert. Sie präsentieren v.a. extrazelluläre Proteine, die über Endozytose oder Phagozytose von der Zelle aufgenommen wurden. Die MHC-II-Moleküle werden in den späten endosomalen Kompartimenten mit Peptid beladen und anschließend in Transportvesikel an die Zelloberfläche transportiert (Mellman und Steinman; 2001; Turley et al.; 2000). Dort werden sie präsentiert und von $CD4^+$ -T-Lymphozyten erkannt (Babbit et al., 1985). Nach der Aktivierung sekretiert die T-Zelle Cytokine, die B-Lymphozyten zur Proliferation und AK-Produktion anregen, wodurch lokale Entzündungsreaktionen beeinflusst werden.

Die Grundstruktur der zuvor beschriebenen MHC-Klasse I- und II-Moleküle ist laut Röntgenstrukturanalyse sehr ähnlich.

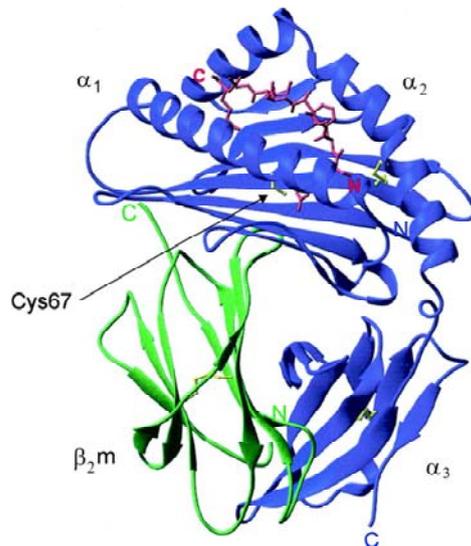


Abb.2: Kristallstruktur von HLA-B27

Gezeigt ist der extrazelluläre Teil des HLA-B*27-Moleküls mit den drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 (blau) mit dem assoziierten β_2 -Mikroglobulin (β_2m , grün).

Die beiden Domänen α_1 und α_2 begrenzen mit ihren zwei α -Helices die Seiten der Peptidbindungsgrube, in der das präsentierte Peptid (rot) eingelagert ist. Der Pfeil markiert eine Besonderheit des HLA-B*27-Moleküls im Vergleich zu anderen Klasse-I-Molekülen: Ein ungepaartes Cystein an Position 67, das die Expression eines HLA-B*27-Homodimers auf der Zelloberfläche erlaubt. (aus Hülsmeier et al., 2002, Fig.2).

Das MHC-Klasse I-Molekül besteht aus einer membrandurchspannenden α -Kette, sowie einem nicht kovalent gebundenem β_2 -Mikroglobulin. Die α -Kette faltet sich in die drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 , wobei die beiden ersten Ketten die Peptidbindungsgrube bilden. Gebundene Peptide weisen eine Länge von 8-11 Aminosäuren (AS) auf.

MHC-Klasse II-Moleküle bestehen aus einem nicht kovalenten Komplex aus einer α - und einer β -Kette, die beide die Membran durchspannen. Die α_1 - und die β_1 -Domäne bilden die Peptidbindungsgrube, die Peptide mit einer Länge von 13-17 AS präsentiert.

Der MHC des Menschen wird als HLA-Komplex (Human Leucocyte Antigen) bezeichnet. Der HLA-Genkomplex ist sehr polygen und polymorph und wird in die HLA-Klassen I, II und III eingeteilt. Da die Expression der HLA-Klasse I und II-Gene kodominant ist, exprimiert jeder Mensch sechs verschiedene MHC-Klasse I-Moleküle sowie mindestens acht verschiedene HLA-Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche.

3. T-Zell-Rezeptor

Ein T-Lymphozyt exprimiert auf seiner Zelloberfläche ca. 30.000 gleiche T-Zell-Rezeptoren. Ein TZR-Molekül ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - und einer β -Kette (Meuer et al., 1983). 5-10% der T-Zellen exprimieren einen $\gamma\delta$ -TZR, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Brenner et al., 1986). Der TZR gehört aufgrund seiner Ähnlichkeit zu den Immunglobulinen zur Ig-Superfamilie. Im Rahmen dieser Arbeit soll lediglich auf den $\alpha\beta$ -TZR eingegangen werden.

3.1 Struktur des TZR

Der TZR besteht aus zwei TZR-Ketten, einer TZR- α - und einer β -Kette, die beide zur Antigenerkennung beitragen. Jede Kette besteht aus einem C-terminalen extrazellulären Bereich von ca. 110 Aminosäuren, einer hydrophoben Transmembrandomäne sowie einem kurzen cytoplasmatischen Bereich von 2-7 Aminosäuren (Kronenberg et al., 1986). Die beiden Ketten sind im extrazellulären Bereich nahe der Zellmembran durch eine Disulfidbrücke verbunden. Der extrazelluläre Bereich beider Ketten besteht aus einer variablen ($V\alpha$ und $V\beta$) und einer konstanten Region ($C\alpha$ und $C\beta$), wobei die V-Region von mehreren Gensegmenten kodiert wird. Die konstante Region ist bei allen TZR gleich.

Das TZR- $\alpha\beta$ -Heterodimer erkennt das Antigen, kann jedoch kein Signal ins Innere der Zelle übermitteln. Aus diesem Grund ist er mit sechs weiteren akzessorischen Polypeptidketten assoziiert, bezeichnet als CD3-Komplex. Die Ketten des CD3-Komplex sind in Form von zwei Heterodimeren (CD3 ϵ - δ , CD3 ϵ - γ) sowie einem $\zeta\zeta$ -Homodimer angeordnet (Clevers et al., 1988).

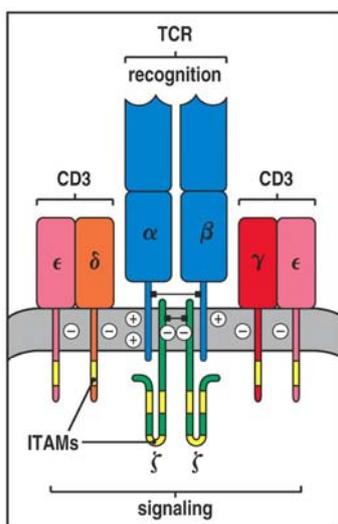


Abb.3: Der T-Zell-Rezeptor-Komplex

Der T-Zell-Rezeptor (blau) besteht aus einer α - und einer β -Kette und ist mit dem CD3-Komplex (rot) assoziiert. Dieser setzt sich aus Heterodimeren (ϵ - δ bzw. ϵ - γ) zusammen und dient wie das Homodimer der beiden ζ -Ketten (grün) der Signalweiterleitung ins Zellinnere, wozu die gelb markierten ITAM-Bereiche benötigt werden.

Jede TZR-Untereinheit besteht aus einer N-terminalen variablen Domäne und einer konstanten Domäne.

Die Assoziation der verschiedenen Untereinheiten erfolgt über gegensätzliche Ladungen in den Transmembranregionen (aus Janeway, Immunbiology 6/e, ©Garland Science 2005, Figure 6-9).

Der CD3-Komplex ist für die Expression des TZR an der Zelloberfläche sowie für die Signalübertragung ins Zellinnere nach der Aktivierung des T-Lymphozyten verantwortlich (Saito et al., 1987; Samuelson et al., 1986, Weiss und Stobo, 1984).

3.2 Rezeptordiversität

T-Zell-Rezeptoren sind sehr variable Moleküle. Nur so kann der Körper sicherstellen, dass die T-Lymphozyten möglichst viele eindringende Pathogene erkennen.

Diese hohe Variabilität der TZR entsteht hauptsächlich durch drei variablen Regionen, die man als komplementaritätsbestimmende Regionen CDR1-3 (complementary determining region) bezeichnet (Jores et al., 1990; Katayama et al., 1995). Sie interagieren mit dem MHC-Peptid-Komplex (Chothia et al., 1988). Die CDR1- und CDR2-Region binden hauptsächlich an die α -Helices des MHC-Moleküls, die CDR3-Region an das Peptid. Aus diesem Grund ist die CDR3-Region besonders variabel und wird als hypervariable Region bezeichnet.

Während der T-Lymphozytenentwicklung entstehen funktionelle T-Zell-Rezeptorgene durch somatische Rekombination aus variablen V-Gensegmenten, D-Elementen („Diversity“), J-Segmenten („Joining“) und konstanten C-Genen (Wilson et al., 1988).

Der Genlocus für die β -Kette (TR β -Gene) besteht aus 46 TRV β -Gensegmenten (V β), zwei TRD β - (D β), 13 TRJ β - (J β) und zwei TRC β -Gensegmenten (C β) (zusammengefasst in Rowen et al., 1996). Der Genlocus für die α -Kette (TR α -Gene) besteht aus etwa 42 TRV α -Gensegmenten, 50 TRJ α -Gensegmenten und einem TRC α -Gensegment (Arden et al., 1995).

Für die Bildung einer funktionellen TZR- β -Kette rearrangiert zunächst ein D- mit einem J-Element, anschließend erfolgt die Verknüpfung mit einem V-Element (zusammengefasst in Rowen et al., 1996). Erst nach erfolgreicher Rekombination der TR β -Gensegmente rearrangieren die TR α -Gene, indem ein V- mit einem J-Segment verknüpft wird.

Für diesen Rearrangementprozess sind stark konservierte Rekombinationssequenzen (RSS) verantwortlich, die die Rekombinationsstellen flankieren. Die Sequenzen bestehen aus einem konservierten Heptamer und einem Nonamer mit dazwischen liegender Spacerregion von 12 bzw. 23 bp. Die einzelnen Gensegmente werden gemäß der 12/23-Regel verknüpft. Dies wird durch einen Komplex verschiedener Enzymen wie z.B. RAG1 und RAG2 (recombination activating genes) katalysiert (Schatz et al., 1992; Fugmann et al., 2000; Gellert et al., 2002). Bei der Verknüpfung zweier Gensegmente kommt es zur Insertion oder Deletion von Nukleotiden. Die zusätzlichen Nukleotide bezeichnet man als P- und N-Nukleotide, wobei P für Palindrom und N für non germline bases steht. Die Insertion der N-Nukleotide wird durch das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) katalysiert, die Deletion von

Nukleotiden erfolgt durch Exonukleasen, die bisher noch nicht identifiziert sind (Gauss und Lieber, 1996; Hughes et al.; 2003). Diese Vorgänge führen zu einer Längenvariabilität von 15-45 Nukleotiden auf der DNA- und mRNA-Ebene (Moss und Bell, 1995). Dies trägt ebenfalls stark zur Rezeptordiversität bei.

Abb. 4 zeigt schematisch die V(D)J-Rekombination der TZR-Gene.

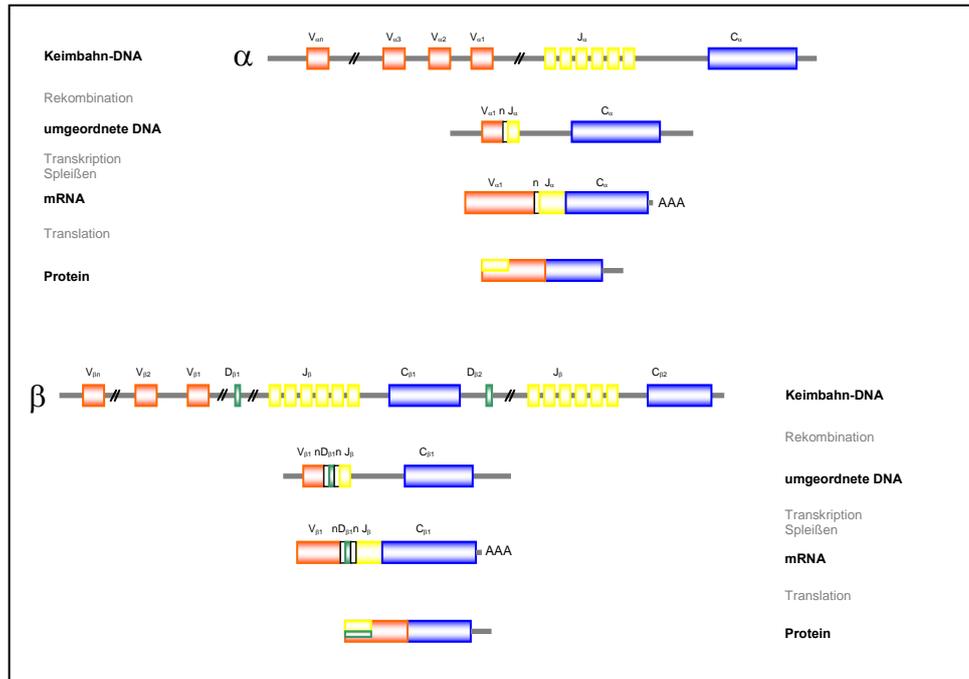


Abb. 4 : Schematische Darstellung der Umordnung und Expression der Gene für die TZR α - und β -Kette

Aus den verschiedenen V-, (D-), J-Keimbahn-Segmenten wird je eines ausgewählt und bei der somatischen Rekombination miteinander verknüpft. Bei der α -Kette wird ein V_{α} -Gensegment mit einem J_{α} -Gensegment verknüpft, so dass ein funktionelles Exon für die variable Region entsteht. Bei der β -Kette wird das Exon für den variablen Bereich von drei Gensegmenten V_{β} , D_{β} , und J_{β} kodiert, welche in zwei Schritten erfolgt. Die Rezeptordiversität wird durch Addition oder Deletion von N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen der Segmente beider Ketten erhöht.

Die mRNA der rearrangierten DNA wird in α - und β -Kettenproteine translatiert und in Form des TZR in Zusammenhang mit dem CD3-Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert.

Alle Variationsmöglichkeiten zusammen ergeben eine Gesamtdiversität von ca. 10^{15} theoretisch möglicher TZR (Davis und Bjorkman, 1988). In jedem Organismus treten jedoch nur etwa $2,4 \times 10^7$ verschiedene Spezifitäten auf (Arstila et al., 2000).

Ein gewisser Prozentsatz aller T-Lymphozyten besitzt zwei TZR- α -Ketten, die mit derselben TZR- β -Kette kombiniert ist. Dieser Anteil schwankt laut Literatur zwischen 2 und 30%. Umstritten ist jedoch, ob beide TZR als funktionelle Moleküle auf der Oberfläche exprimiert werden (He et al., 2002; Padovan et al., 1993; Prinz et al., 2002).

4. Der ternäre Komplex aus T-Zell-Rezeptor, Peptid und MHC-Molekül

4.1 Bindungsstudien

Der Komplex aus einem in Kap. I.2 und I.3 beschriebenen TZR mit einem MHC-Molekül und daran gebundenem Peptid wurde durch Kristallisationsexperimente untersucht. Die Zahl kristallisierter und analysierter $\alpha\beta$ -TZR-Peptid/MHC-Komplexe wuchs bis heute auf ca. 24 an (zusammengefasst in Rudolph et al., 2006 und Garcia et al., 2005). Die Analysen zeigten, dass die CDR1- und die CDR2-Region des TZR bevorzugt mit den α -Helices des MHC-Moleküls in Kontakt treten, die CDR3-Schleife jedoch mit dem Peptid interagiert. Da die CDR3-Region durch die bereits erwähnten P- und N-Nukleotidsubstitutionen am variabelsten ist, bestimmt diese die Spezifität des TZR (zusammengefasst in Krogsgaard und Davis, 2005; Garcia et al., 1999). Bindungsstudien mit der Methode der Alanin-Substitution deuten darauf hin, dass AS-Reste der MHC-Helices für die erste Interaktion mit dem TZR verantwortlich sind, das Peptid hauptsächlich die Dauer der Interaktion beeinflusst (Wu et al., 2002).

Der TZR-MHC-Bindungswinkel variierte bei den untersuchten TZR-Peptid/MHC-Komplexen um bis zu 49° (zusammengefasst in Rudolph et al., 2006 und Krogsgaard und Davis, 2005). Generell liegt das TZR-Heterodimer annähernd diagonal relativ zur Längsachse der MHC-Bindungstasche (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996). Die $V\alpha$ -Domäne ist hierbei über der N-terminalen Hälfte des in ausgestreckter Konformation gebundenen Peptids lokalisiert, während die $V\beta$ -Domäne über dem C-terminalen Teil des Peptids liegt (zusammengefasst in Rudolph et al., 2006 und Rudolph et al., 2002). Abb. 5 zeigt die Struktur eines $\alpha\beta$ -TZR-Peptid/MHC-Komplexes von der Seite (a) sowie von oben (b).

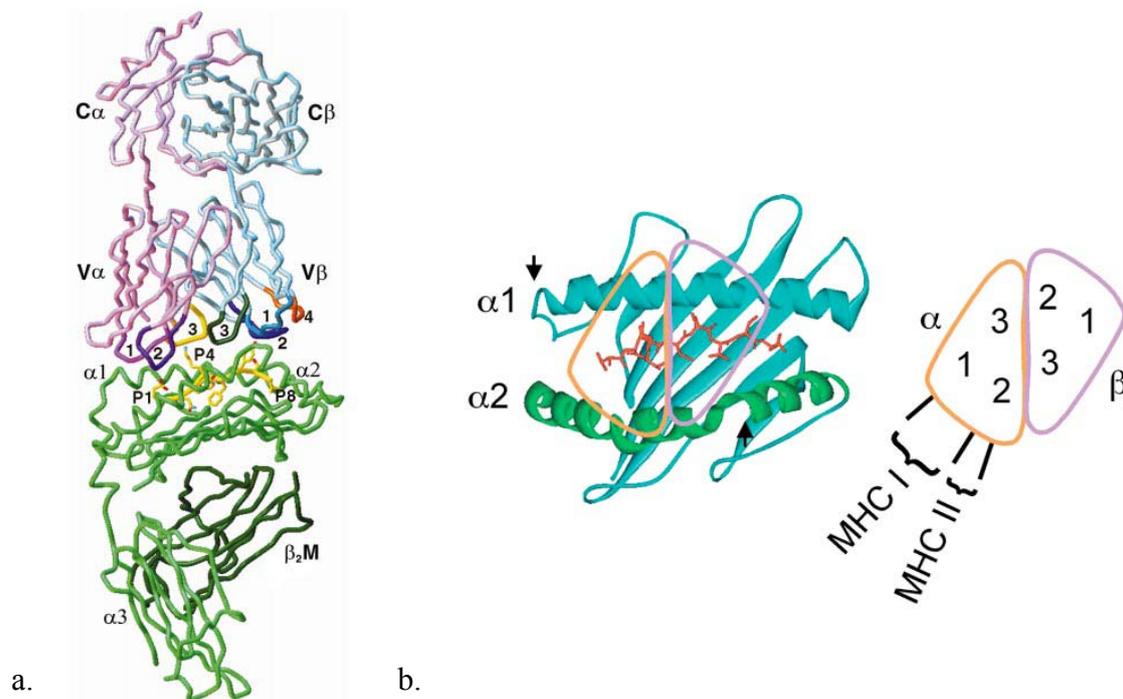


Abb. 5a: Struktur des trimolekularen Komplexes von TZR-Peptid-MHC-I

Der obere Teil der Abbildung zeigt das TZR-Molekül mit den farbig markierten CDR3-Regionen. Die CDR1 und CDR2-Schleifen der β -Kette hellblau bzw. dunkelblau; die CDR1 und CDR2-Schleifen der α -Kette hell- bzw. dunkelviolett; die CDR3-Schleife der α -Kette gelb, die der β -Kette grün. Rot ist die HV4-Schleife der β -Kette, an die bevorzugt virale Superantigene binden. Der MHC-I-Peptid-Komplex befindet sich im unteren Teil der Abbildung. Die α_1 - und α_2 -MHC-Domäne bilden die Peptidbindungsgrube, in der das präsentierte Peptid (gelb) mit 8 Aminosäuren (P1-P8) verankert ist (nach Garcia et al.; 1998, Fig.1).

Abb. 5b: TZR-Peptid-MHC-Komplex (Aufsicht)

Die Abbildung links zeigt die Bindung eines TZR an einen Peptid-MHC-Komplex aus Sicht der T-Zelle. In rot ist das Peptid dargestellt, in grün und blau die Ketten des MHC-I-Moleküls HLA-A2. Das rechte Bild zeigt die ungefähre Lage der CDR-Regionen der TZR- α - und β -Kette (nach v.d.Merwe & Davis; 2003).

4.2 Affinität und Degeneration

Die Affinität der Interaktion zwischen TZR und Peptid/MHC-Komplex ist sehr niedrig. Dies zeigt die Dissoziationskonstante von $0,1-500\mu\text{M}$. Die Assoziation erfolgt langsam, die Dissoziationsreaktion schnell (zusammengefasst in Davis et al., 1998). Diese schnelle Dissoziationsrate im Bereich von $0,01-5\text{s}^{-1}$ korrespondiert mit einer Halbwertszeit von $70-0,1$ sec (Margulies et al., 1997). Trotz der geringen Affinität und der schnellen Dissoziation des TZR-Peptid/MHC-Komplexes ist die Spezifität im T-Zell-Signaling dennoch sehr hoch (zusammengefasst in Rudolph et al., 2002).

Wie ist es nun möglich, dass das TZR-Repertoire eines Menschen alle Peptid/MHC-Komplexe erfasst, obwohl die Anzahl möglicher Peptid/MHC-Komplexe die Menge an TZR-Molekülen weit übersteigt? Dies lässt sich durch die starke Degeneration des TZR erklären (Mason et al., 1998; Hemmer et al., 1998; Wilson et al., 1999). Degeneration bedeutet, dass derselbe TZR

durch viele verschiedene Peptid/MHC-Komplexe aktiviert werden kann, dass gleichzeitig aber auch viele TZR denselben Peptid/MHC-Komplex erkennen (zusammengefasst in Wilson et al., 2004). Da die TZR bei ihrer Entstehung im Thymus noch keinen AG-Kontakt hatten, werden durch die starke Degeneration viele TZR generiert, welche spezifisch für eine Selbst-AG sind. Diese werden jedoch anschließend durch die negative Selektion im Thymus eliminiert.

Die starke Degeneration ist nur aufgrund der hohen Flexibilität der CDR3-Region des TZR sowie der Variabilität im Winkel zwischen der V α - und der V β -Kette möglich. So kann sich der TZR gut an die eher starre Peptid/MHC-Bindungsregion anpassen (Willcox et al., 1999; Boniface et al., 1999). Gebundene bzw. nicht gebundene TZR-Moleküle weisen eine unterschiedliche Struktur auf. Dies kann man mit dem Vorgang des sog. „induced fit“ erklären. Die Bindungspartner korrigieren nach einer ersten Formation eines zunächst nicht ganz optimalen Komplexes ihre Lage, um die Bindung so zu optimieren (zusammengefasst in Housset und Malissen, 2003).

Welche Voraussetzungen muss nun ein T-Zell-Repertoire erfüllen, um potentiell pathogene AG zu erkennen, aber gleichzeitig die Gefahr einer Autoimmunität zu minimieren? Zum einen muss das Repertoire eine große Anzahl verschiedener Peptid/MHC-Liganden erkennen, damit kein Pathogen im Körper unentdeckt bleibt. Die Antigen-Erkennung muss dennoch spezifisch genug sein, um genau zwischen fremden und eigenen Peptiden unterscheiden zu können. Des Weiteren muss die Geschwindigkeit der T-Zell-Antwort ausreichend groß sein. Berechnungen ergaben, dass jeder einzelne T-Zell-Klon eines T-Zell-Repertoires mindestens eine Million verschiedene MHC-assoziierte Peptide erkennen muss (Mason et al., 1998). Dies können nahezu homologe Peptide sein, jedoch auch Peptide mit wenig oder keiner Sequenzhomologie. Oftmals sind nur drei bis vier AS-Reste für die TZR-Peptid/MHC-Interaktion nötig. Dies zeigte Gautam et al. (1992) durch die Methode der Alaninsubstitution. Die Degeneriertheit in der T-Zell-Spezifität konnte man ebenfalls in Kristallisationsstudien zeigen, in denen oftmals nur drei bis vier AS-Reste des Peptids zum TZR hin orientiert waren (Bjorkman et al., 1987; Fremont et al., 1992; Madden et al., 1991; Stern et al., 1994).

Auch bei der Suche möglicher AG durch eine Positional Scanning-Combinatorial Peptid Library (PS-CPL), die im Rahmen dieser Arbeit angewandt wurde, ist die Degeneration der TZR-Moleküle notwendig (siehe Material und Methoden II.4.9). Man braucht eine hohe Anzahl spezifischer Peptide, um in der Analyse ein eindeutiges Signal detektieren zu können. Weist ein TZR eine zu geringe Degeneration und eine sehr schwache Affinität auf, ist es durch diese Methode nur schwer möglich, das AG zu detektieren.

Nachdem nun der Aufbau und die Funktion der verschiedenen Moleküle eines TZR-Peptid/MHC-Komplexes ausführlich erklärt wurden, wird in den nachfolgenden Kapiteln die Rolle der T-Lymphozyten in Autoimmunerkrankungen näher erläutert. Dies führt direkt zur Fragestellung, welche dieser Arbeit zu Grunde liegt.

5. Die Rolle von T-Lymphozyten in Autoimmunerkrankungen

In einem gesunden Organismus finden normalerweise keine Angriffe des eigenen Immunsystems gegen körpereigenes Gewebe statt. Selbstreaktive Lymphozyten werden während der Lymphozyten-Reifung im Thymus frühzeitig eliminiert. Außerdem unterliegen die T- und B-Zellen, die der Selektion entgangen und autoreaktiv sind, einem Kontroll-Suppressor-Mechanismus, der eine Aktivierung selbstreaktiver Lymphozyten verhindert (Wekerle et al., 1992). Bei Menschen mit einer Autoimmunerkrankung jedoch entfalten selbstreaktive Lymphozyten eine pathogene Wirkung, indem sie gegen körpereigenes Gewebe vorgehen. In den meisten Autoimmunerkrankungen treten sowohl B- als auch T-Lymphozyten in unterschiedlicher Gewichtung als Initiatoren und Mediatoren auf. Bei der Multiplen Sklerose (MS), einer entzündlichen Erkrankung des Zentralen Nervensystems, durchdringen aktivierte CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke und zerstören die Myelinscheide (Stinissen et al., 1997; zusammengefasst in Steinman und Zamvil, 2003).

Überwiegend CD8⁺-T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen sind die Polymyositis und die Einschlusskörperchenmyositis, beides entzündliche Muskelerkrankungen (Hohlfeld und Engel, 1994).

Weitere Autoimmunerkrankungen, bei denen v.a. T-Lymphozyten eine pathogene Rolle spielen sind die Rheumatoide Arthritis, bei der die Gelenkkapseln zerstört werden (Kinne et al., 1997) sowie die Insulin-abhängige Diabetes mellitus (zusammengefasst in Bach, 1994; Tisch und McHewitt, 1996). Hier infiltrieren die T-Zellen die Bauchspeicheldrüse und zerstören die insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln.

Ein Beispiel für eine überwiegend B-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist Myasthenia gravis (Hohlfeld und Engel, 1994). Bei dieser Erkrankung binden autoreaktive AK an die Acetylcholinrezeptoren der neuromuskulären Endplatte und verhindern so die Erregungsweiterleitung vom Nerv auf den Muskel.

Autoimmunerkrankungen sind vermutlich multifaktoriell bedingt, d.h. sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Präposition, Geschlecht und hormoneller Status spielen bei der Entstehung der Krankheit eine Rolle.

6. Inflammatorische Myopathien und Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose und die entzündlichen Muskelerkrankungen Polymyositis und Einschlusskörperchenmyositis sind Autoimmunerkrankungen, in denen T-Lymphozyten in das Gehirn bzw. den Muskel eindringen und dort körpereigenes Gewebe zerstören. Die MS ist im Vergleich zur Myositis jedoch wesentlich komplexer. Zudem ist es schwierig gut erhaltenes Hirngewebe für Analysen zu bekommen. Aus diesem Grund wurden hier zunächst Muskelbiopsien von Myositispatienten analysiert.

6.1 Inflammatorische Myopathien

Es gibt zwei CD8-abhängige entzündliche Muskelerkrankungen: die Polymyositis (polymyositis; PM) sowie die Einschlusskörperchenmyositis (inclusion body myositis; IBM) (zusammengefasst in Dalakas, 2002). In beiden Erkrankungen dringen cytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten in die Muskelfasern ein und zerstören diese (Hohlfeld und Engel, 1994). Die Inzidenz dieser Myopathien beträgt ca. 0,77/100.000 pro Jahr und zählt somit zu den häufigsten Myopathien bei Kindern und Erwachsenen (Mastaglia et al., 2002).

Obwohl die Myositis eine relativ seltene Autoimmunerkrankung ist, birgt sie für die Etablierung der TZR-Identifikation und Antigensuche einige wichtige Vorteile. Da man aus diagnostischen Gründen jedem Patienten mit Verdacht auf Myositis eine Muskelbiopsie entnimmt, steht eine große Anzahl Gewebematerial für Analysen zur Verfügung. Außerdem kann man leicht potentiell autoaggressive T-Lymphozyten von nicht relevanten bystander-Zellen unterscheiden. Wie dies technisch durchgeführt wird, ist in Abschnitt I.7.2 näher erläutert.

Zur Diagnose der Krankheit zieht man im Wesentlichen drei Kriterien heran. Die Analyse des Muskelenzymspiegels im Blut, ein Elektromyogramm sowie die Analyse einer Muskelbiopsie. Bei Patienten mit einer Myositis ist der Keratinkinasespiegel im Blut meist stark erhöht und auch das Muskelgewebe zeigt Auffälligkeiten. Man erkennt die Nekrose der Muskelfibrillen, die Einwanderung von CD8⁺-T-Lymphozyten in den Muskel, Amyloid-Ablagerungen sowie die starke Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche. Ein gesunder Organismus exprimiert normalerweise keine MHC-Klasse I-Moleküle auf der Muskelzelloberfläche (Hohlfeld und Engel, 1994; Engel et al., 1994). Die MHC-Moleküle können den einwandernden CD8⁺-T-Lymphozyten AG präsentieren, die deren Aktivierung und die Zerstörung der Muskelzelle bewirken.

6.2 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems. T- und B -Lymphozyten sowie Makrophagen durchdringen die Blut-Hirn-Schranke und gelangen so in das Zentrale Nervensystem. Dort zerstören sie durch die Ausschüttung von Cytokinen die Oligodendrogliazellen, die für die Herstellung der Myelinscheide verantwortlich sind. Das fehlende Myelin verhindert eine einwandfreie Erregungsweiterleitung (zusammengefasst in Steinman et al., 2002). Die ersten Krankheitssymptome treten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Weltweit zählt man etwa 1 Million Betroffene. Häufig auftretende Symptome sind zunehmende Sehschwäche, Koordinationsprobleme und damit einhergehende Gehstörungen (McFarlin and McFarland., 1982; zusammengefasst in Steinman und Zamvil; 2003). Der Krankheitsverlauf kennzeichnet sich bei 85-90% der Patienten durch das wiederholte Auftreten und Rückbilden verschiedener neurologischer Symptome. Einen solchen Verlauf bezeichnet man als schubförmiger-remittierender Verlauf, der später häufig in eine sekundär progrediente MS übergeht. Die restlichen 10-15% weisen eine primär progrediente MS auf. Dies zeigt sich in einem kontinuierlichen Fortschreiten der Erkrankung ohne eindeutige Schübe. (zusammengefasst in Sospedra und Martin, 2005 und Hafler, 2004). Es ist bekannt, dass sowohl Umwelteinflüsse als auch die genetische Veranlagung bei der Entstehung der Krankheit beteiligt sind (Ebers et al., 1995; Ebers et al., 1998).

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung von MS ist, dass man den Patienten aus diagnostischen Gründen zu Lebzeiten normalerweise keine Hirnbiopsie entnimmt. Autopsiematerial ist jedoch für eine Analyse oftmals nicht brauchbar. Dies grenzt die Zahl verwertbarer Gewebeproben drastisch ein.

Die Biopsie des MS-Patienten FE, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, hat man diesem zu Lebzeiten entnommen, da zunächst der Verdacht auf einen Hirntumor bestand. Zum besseren Verständnis soll an dieser Stelle kurz die Vorgeschichte dargestellt werden, welche schließlich zur erneuten Analyse der Biopsie im Rahmen dieser Arbeit führte. 1996 wurde die Hirnbiopsie des Patienten FE durch Babbe et al. (2000), 2001 das Blut durch Skulina et al. (2004) in einer CDR3-Spektratyping-Analyse auf expandierte TZR- β -Ketten untersucht. Die V β 1-J β 2.3-TZR-Kette trat hier expandiert auf. Diese Expansion konnten wir im Blut des Patienten 2003 erneut detektieren. Die anschließende Untersuchung einzelner CD8⁺/V β 1⁺-Blutzellen durch die in dieser Arbeit beschriebene Einzelzell-RT-PCR lieferte den Verdacht auf eine korrespondierende α -Kette. Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurde erneut Blut des Patienten analysiert. Wir konnten jedoch die V β 1-J β 2.3-Expansion durch CDR3-Spektratyping nicht mehr detektieren. Der Grund hierfür könnte laut behandelndem Arzt die geänderte

Medikation des Patienten sein. Die bisher schubförmig verlaufende MS-Erkrankung wandelte sich in eine sekundär progressive Form. Um die vermutete α -Kette dennoch zu bestätigen, wurde erneut die Hirnbiopsie zur Analyse herangezogen. Die Ergebnisse der durchgeführten CDR3-Spektratypings sowie die Analyse der V β 1⁺ Einzelzellen aus dem Blut und dem Hirn sind im Ergebnisteil näher dargestellt.

Der folgende Abschnitt erläutert kurz die Fragestellung dieser Arbeit sowie die prinzipielle Vorgehensweise.

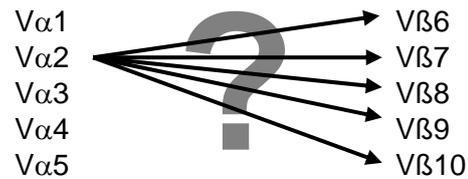
7. Fragestellung

Bei Patienten mit Myositis bzw. Multipler Sklerose wandern T-Lymphozyten in den Muskel bzw. das Gehirn ein. Weshalb diese Zellen des Immunsystems dort einwandern und welches Antigen sie erkennen, ist bislang noch nicht geklärt. Ein Schritt zur Beantwortung dieser Frage ist die Analyse des TZR einzelner, ins Zielgewebe infiltrierter potentiell autoaggressiver T-Zellen. Diese sollten aus Muskel- bzw. Hirngewebe der Patienten mittels Lasermikrodissektion gewonnen und mittels Einzelzell-RT-PCR analysiert werden. Nach der Identifizierung der TZR sollten diese durch funktionelle Expression in einer murinen Hybridomzelllinie wieder „zum Leben erweckt“ und für erste Versuche zur AG-Suche eingesetzt werden. Durch die Identifizierung eines Antigens könnte man möglicherweise Rückschlüsse auf die Krankheitsursache ziehen und effektivere Therapieansätze ermöglichen.

7.1 Analyse potentiell autoaggressiver T-Lymphozyten

Um beide TZR-Ketten aus der gleichen T-Zelle zu amplifizieren, muss eine sehr sensitive Einzelzell-RT-PCR-Methode angewandt werden, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Nur wenn man sicherstellen kann, dass die erhaltene α - und β -Sequenz von derselben T-Zelle stammen, kann man einen funktionellen TZR generieren und diesen für die Antigen-suche einsetzen.

Es gibt einige Methoden aus Gesamt-cDNA durch speziell ausgewählte Oligonukleotide die variablen und hypervariablen Bereiche der TZR- α - und β -Ketten zu amplifizieren (zusammengefasst in Dornmair et al: 2003 Frohmann et al., 1988; Uematsu et al., 1991; Choi et al., 1989). Anhand dieser Analysemethoden bekommt man jedoch lediglich einen Überblick über das T-Zell-Repertoire. Man kann jedoch nicht eindeutig auf die exakte $\alpha\beta$ -TZR-Paarung schließen, da die Analyse mit dem gesamten Material gleichzeitig durchgeführt wird. Nachfolgendes Schema verdeutlicht diese Problematik.



Man erhält zwar die Sequenzen aller im Gewebe vorhandenen TZR-Ketten, kann jedoch keine eindeutige Zuordnung treffen.

Alle bisher durchgeführten Versuche, aus Gewebe anhand von Mikrodisektion Einzelzellen zu isolieren und diese mit Einzelzell-PCR zu analysieren, konnten lediglich die TZR- β -Kette nicht aber die gepaarte α -Kette amplifizieren. Als Template für die PCR-Reaktion verwendete man hier genomische DNA und keine RNA. Der Vorteil genomischer DNA ist die weitaus größere Stabilität während des Färbe- und Isolationsprozesses. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass nur eine Kopie als Template vorliegt (Babbe et al., 2000; Hofbauer et al., 2003; Skulina et al., 2004).

Beide TZR-Ketten aus derselben Zelle zu amplifizieren, gelang bisher nur mit lebenden Zellen. Diese wurden nach Homogenisieren des Gewebes mittels FACS-Sort vereinzelt und nach Proliferation in die Analyse eingesetzt (Baker et al., 2002; Hamroumi et al., 2003; Tahara et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal beide TZR-Ketten derselben, aus Gewebe isolierten Einzelzelle, zu amplifizieren. Als Template diente RNA. Die RNA ist im Gegensatz zur DNA zwar wesentlich instabiler, kommt jedoch in höherer Kopienzahl vor und besteht nur aus der codierenden Sequenz.

Der folgende Abschnitt zeigt am Beispiel einer Muskelbiopsie die einzelnen Schritte, die nötig sind, um aus einer Gewebeprobe potentiell autoaggressive T-Lymphozyten zu isolieren und zu analysieren.

7.2 Vorgehensweise zur Detektion und Analyse potentiell autoaggressiver T-Lymphozyten aus Gewebe

Potentiell autoaggressive T-Lymphozyten aus einer Muskelbiopsie müssen zwei Kriterien erfüllen. Zum einen müssen sie im Gewebe klonal expandiert sein, da dies auf eine Antigenvermittelte Immunantwort schließen lässt. Zum anderen müssen sie im engen Kontakt zur Muskelfaser stehen. Dieser enge Kontakt zeigt ebenfalls die potentielle Autoaggressivität der T-Zelle. Nicht kontaktierende sog. bystander-Zellen, die wahrscheinlich durch Cytokinausschüttung angelockt wurden, kann man so klar abgrenzen.

Um die expandierten β -T-Zell-Populationen einer Gewebebiopsie zu detektieren, verwendeten wir das CDR3-Spektratyping. Bei dieser Methode misst man die Länge der CDR3-Regionen der TZR- β -Ketten. Man erhält bei einer polyklonalen Population eine Gauß'sche Normalverteilung, bei einer (oligo)klonalen Population erkennt man einen einzelnen Peak (zusammengefasst in Pannetier et al., 1995; siehe Abb. Material- und Methodenteil II.2.10). Eine klonale Expansion deutet auf eine Antigen-vermittelte Immunantwort hin und kann somit als Kriterium für potentiell autoaggressive T-Zellen angesehen werden (vgl. Abb.6 Schritt 1). Die Sequenz der expandierten TZR- β -Kette, die man durch die CDR3-Spektratyping-Analyse erhielt, konnten wir zum Entwerfen der klonspezifischen Oligonukleotide der Einzelzell-PCR verwenden. Im nächsten Schritt färbten wir die Biopsie mit einem AK gegen die V β -Region der expandierten Population. T-Zellen, die direkten Kontakt mit der Muskelfibrille aufwiesen, konnten wir so detektieren und durch Lasermikrodissektion isolieren (Schritt 2). Dieser enge Kontakt zwischen T-Zelle und Zielzelle stellt das zweite wichtige Kriterium potentiell autoaggressiver T-Zellen dar.

Die isolierten T-Lymphozyten wurden anschließend mit Hilfe der Einzelzell-RT-PCR analysiert. Nach der reversen Transkription beider Ketten wurden diese in einer Prä-Amplifikationsreaktion vermehrt (Schritt 3). Da wir die Sequenz der expandierten β -Kette aus dem CDR3-Spektratyping bereits kannten, konnten wir für diese klonspezifische Primer einsetzen. In einer zweiten Amplifikationsrunde wurden alle Zellen auf eine expandierte β -Kette untersucht (Schritt 4) und nur die positiven Zellen auf eine korrespondierende α -Kette analysiert. Da nicht bekannt war, welche α -Kette mit der β -Kette paart, haben wir „universelle Primer Sets“ in die PCR eingesetzt. Mit dieser Auswahl an Primern kann man alle theoretisch möglichen α -Ketten amplifizieren (Schritt 5). Dieser Schritt ist der schwierigste Teil der Analyse. Durch die große Anzahl verschiedener V α -Regionen müssen viele verschiedene Oligonukleotide gleichzeitig in die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Dadurch ist es durchaus möglich, dass sich die Primer während der PCR-Reaktion gegenseitig behindern oder durch die Bildung von Primerdimeren nicht mehr für die Amplifikation zur Verfügung stehen. Da die Analyse mit klonspezifischen Primern wesentlich sensitiver ist, wurden alle β -positiven Zellen nochmals mit Primern für die in diesem Patienten bereits detektierten α -Ketten analysiert. Somit konnten wir die bereits gefundenen α -Ketten bestätigen und eventuell weitere $\alpha\beta$ -Pärchen detektieren (Schritt 6).

Die gefundenen $\alpha\beta$ -Pärchen wurden dann zu einem funktionellen TZR-Molekül rekonstituiert (Schritt 7) und in der Maus-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ rekombinant exprimiert. Mit dem auf diese Weise „wieder zum Leben erweckten“ TZR-Molekül, konnten wir nun die Suche nach einem möglichen Antigen beginnen (Schritt 8).

Abb. 6 zeigt die einzelnen Schritte nochmals in einer Graphik zusammengefasst.

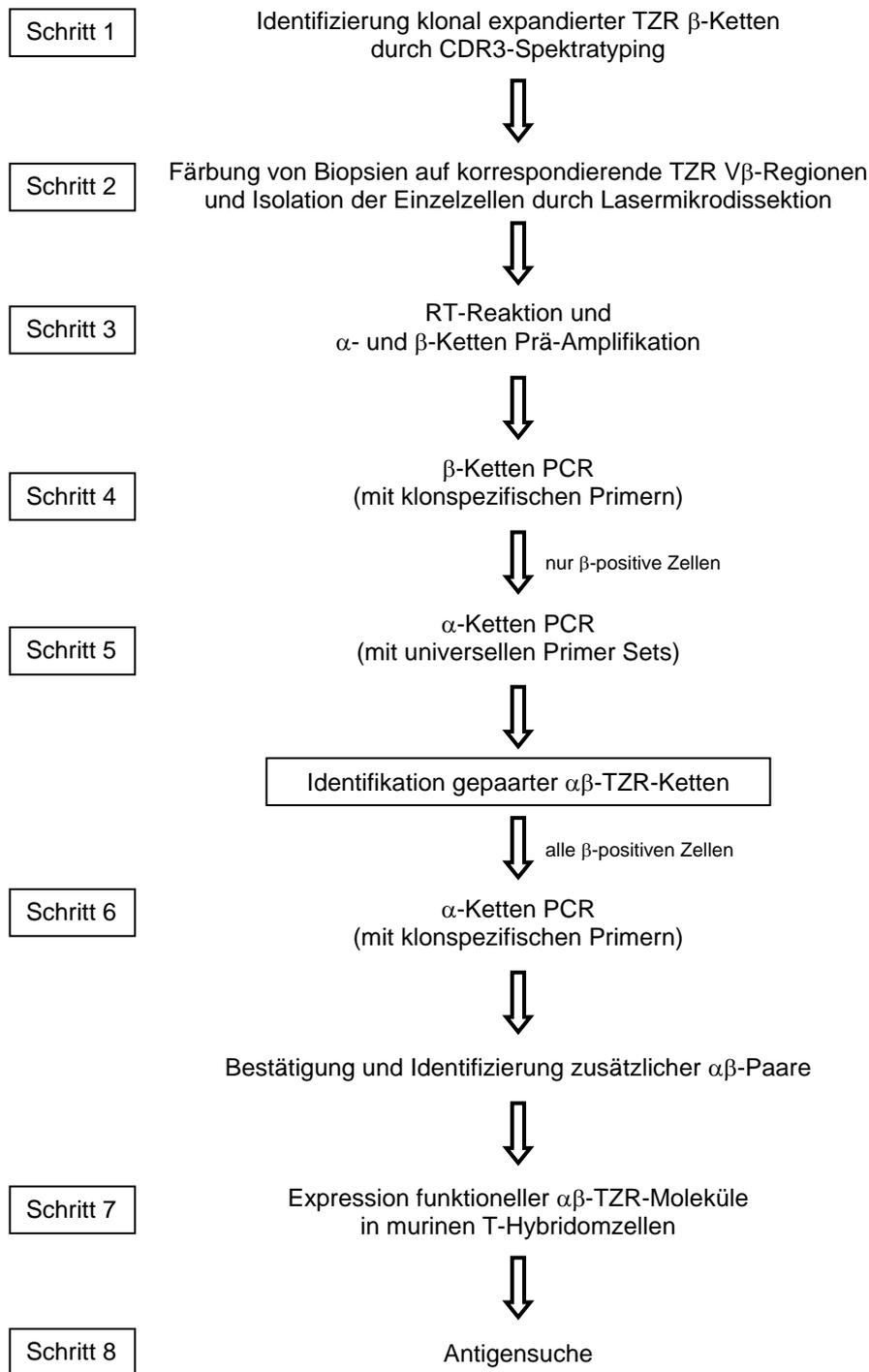


Abb. 6: Vorgehensweise zur Isolation und Identifizierung von $\alpha\beta$ -TCR-Pärchen aus Gewebe

Dass Schema zeigt die einzelnen Schritte, die notwendig sind, um aus einer Gewebsbiopsie potentiell autoaggressive T-Lymphozyten detektieren, isolieren und analysieren zu können. Nach der Detektion expandierter TZR-β-Ketten (Schritt 1) erfolgt die Färbung und Isolation der Zellen (Schritt 2). Die Analyse der Einzelzellen konzentriert sich nach der cDNA-Synthese und der Prä-Amplifikation (Schritt 3) zunächst auf die β-Kette (Schritt 4). Die β-positiven Zellen werden dann auf eine gepaarte α-Kette untersucht und bestätigt (Schritt 5 und 6). Die αβ-Paare werden dann in eine Hybridomzelllinie transfiziert und zur Antigensuche verwendet. (verändert nach Seitz et al., 2006)

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Autoklav Varioklav EP-Z500, EV-Z500	H+P Labortechnik
Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Videokameras:	
CCD Videokamera	Sony
HVD30	Hitachi
AxioCAM HRc	Zeiss
Computerprogramme:	
MicroDissection	Molecular Machines
Palm Robo@V3.0	PALM Microlaser
Genescan 3.2.1	Applied Biosystems
Sequencing Analysis 3.4.1	Applied Biosystems
Elektrophoresekammern/Netzgeräte	Amersham-Pharmacia, institutseigene Werkstatt
Elektroporationsgerät Gene Pulser™	Bio-Rad
ELISA-Reader MR 4000	Dynatech
Eismaschine	Ziegra
FACS:	
FACScan, FACSCalibur	Becton-Dickinson
FACS Sorter Facs Vantage SE	Becton-Dickinson
Geldokumentationsanlage Image Master VDS	Pharmacia Biotech
Heizblöcke Thermomixer 5436	Eppendorf
Kryotom CM3050	Leica
Kühlinkubator Frigomix U2 (Braun)	
Gefrierschrank C660	New Brunswick Scientific
Laser	SL Mikrotest
Leuchtschirm	Bachofer Laborgeräte
Lyophilisator LYOVAC GT 2	Leybold
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik
Mikroskope:	
Axiovert 25	Zeiss
Axiovert 200M	Zeiss
AxioPlan2	Zeiss
Mikrowellenofen	Alaska
Öl-Vakuumpumpe	ABM
PCR-Thermocycler:	
T personal	Biometra
GeneAmp PCR system 9600	Perkin Elmer

pH-Meßgerät pH521	WTW
Pipetten	Gilson, Eppendorf
Röntgenbestrahlungsgrät	Siemens, Stabilipan
Schüttelinkubatoren HT	Infors
Sequenzierer ABI 377	Applied Biosystems
Spektrophotometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Sterilbank BSB6A	Flow Laboratories
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Waagen:	
L2200P	Sartorius
MP2	Sartorius
Wasserbadinkubator MA6	Lauda
Zentrifugen:	
5417 C	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Haereus, Kendro
Speed Vac Concentrator	Savant

1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia, New England Biolabs, GibcoBRL, Dianova, Difco, Fluka, Merck, MWG Biotech, Novagen, Promega, Qiagen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Weitere Bezugsquellen sind im Einzelnen in der Methodenbeschreibung aufgeführt.

1.3 Patientenmaterial

Das Biopsiematerial der beiden Myositispatienten wurde uns von Prof. Dr. Andrew G. Engel von der Mayo Klinik in Rochester (USA) zur Analyse überlassen. Die Biopsie des MS-Patienten FE wurde in der neurochirurgischen Abteilung der Universität Bonn entnommen. Das Blut hat sich dieser von seinem Hausarzt abnehmen lassen. Alle Gewebe- bzw. Blutproben wurden den Patienten nach erfolgter Einverständniserklärung aus diagnostischen Gründen entnommen.

Patient	Diagnose
PM16488	Polymyositis
IBM15551	Einschlußkörperchenmyositis
FE	Multiple Sklerose

1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5 α F'IQ	F ⁻ , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ ,mK ⁺), <i>supE44</i> , λ^- , <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>

1.5 Vektoren

Name	Größe	Resistenzgene	Bezugsquelle/Referenz
pBRdel (pBR328 Del PvuII/EcoRV; ohne Chloramphenicol ^R)	3,4kb	amp ^R tet ^R	Klaus Dornmair (Martinsried)
pRSV5 neo	5,1kb	amp ^R neo ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Long et al., 1991
pRSV5 hygro	5,1kb	amp ^R hygro ^R	Klaus Dornmair (Martinsried) Long et al., 1991

1.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden entsprechend der Richtung und der Lage in der zu amplifizierenden Sequenz mit folgenden Zusätzen versehen:

- for: forward-Primer, „sense“ Orientierung des Oligonukleotids in der 5'→3'-Richtung des kodierenden DNA-Strangs
- rev: reverse-Primer, „antisense“ Orientierung des Oligonukleotids in der 3'→5'-Richtung des kodierenden DNA-Strangs
- out: Primer für die Voramplifikation der nested-PCR
- in: Primer für die nested-PCR

1.6.1 Primer für die Einzelzell-RT-PCR

1.6.1.1 RT-Primer

α -Ketten: C α -RT 5'-GCC ACA GCA CTG TTG C-3'
 β -Ketten: C β -RT 5'-GAA GAA GCC TGT GGC C-3'

1.6.1.2 Primer für die Prä-Amplifikation

α -Ketten (universelle Primer Sets)

V α -1¹⁴-for-out 5'-AGS AGC CTC ACT GGA GTT G -3'
V α -1²³⁵-for-out 5'-CTG AGG TGC AAC TAC TCA TC -3'
V α -2-for-out 5'-CAR TGT TCC AGA GGG AGC C -3'
V α -3,25-for-out 5'-GAA RAT GYC WCC ATG AAC TGC -3'
V α -4,20-for-out 5'-WTG CTA AGA CCA CCC AGC C -3'
V α -5-for-out 5'-AGA TAG AAC AGA ATT CCG AGG -3'

V α -6,14-for-out	5'-RYT GCA CAT ATG ACA CCA GTG -3'
V α -7-for-out	5'-CAC GTA CCA GAC ATC TGG G -3'
V α -8,21-for-out	5'-CCT GAG YGT CCA GGA RGG -3'
V α -9-for-out	5'-GTG CAA CTA TTC CTA TTC TGG -3'
V α -10,24-for-out	5'-AST GGA GCA GAG YCC TCA G -3'
V α -11-for-out	5'-TCT TCA GAG GGA GCT GTG G -3'
V α -12-for-out	5'-GGT GGA GAA GGA GGA TGT G -3'
V α -13,19,26-for-out	5'-SAA STG GAG CAG AGT CCT C -3'
V α -15-for-out	5'-CCT GAG TGT CCG AGA GGG -3'
V α -16-for-out	5'-ATG CAC CTA TTC AGT CTC TGG -3'
V α -17-for-out	5'-TGA TAG TCC AGA AAG GAG GG -3'
V α -18-for-out	5'-GTC ACT GCA TGT TCA GGA GG -3'
V α -22,31-for-out	5'-CCC TWC CCT TTT CTG GTA TG -3'
V α -23,30-for-out	5'-GGC ARG AYC CTG GGA AAG G -3'
V α -27-for-out	5'-CTG TTC CTG AGC ATG CAG G -3'
V α -28-for-out	5'-AGA CAA GGT GGT ACA AAG CC -3'
V α -29-for-out	5'-CAA CCA GTG CAG AGT CCT C -3'
V α -32-for-out	5'-GCA TGT ACA AGA AGG AGA GG -3'

C α -rev-out 5'-GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG -3'

β -Ketten (klonspezifische Primer)

PM16488:	V β -1-for-out	5'-TGT ACT GGT ACC AAC AGA GC -3'
	16488 β -rev-out	5'-CTC TAC AAC GGT TAA CCT GG -3'
IBM15551:	V β -23-for-out	5'-GAA ACA GCC ACT CTG AAA TGC -3'
	15551 β -rev-out	5'-TGA GTC TGG TGC CTT GTC C -3'
FE	BV1-for-i-out	5'-TGT ACT GGT ACC AAC AGA GC -3'
	Fe_BV1-BJ2.3-2	5'-CCT GGG CCA AAA TAC TGC G -3'
COP-1/17	V β -17-for-out	5'-AGG AAG GAC AGA ATG TGA CC -3'
	COP-1/17 β -rev-out	5'-TGA GTC TGG TGC CTT GTC C -3'

1.6.1.3 Klonspezifische Primer für die TZR- β -Ketten

β -Ketten (klonspezifische Primer)

PM16488:	V β -1-for-in	5'-GGA GAA GAG AGA GCA AAA GG -3'
	16488 β -rev-in	5'-CGA AGG TGT AGC CAT AGA GTC -3'
IBM15551:	V β -23-for-in	5'-AAA GGA AGC ATC CCT GAT CG -3'
	15551 β -rev-in	5'-AAG AAA GCT TCA GTG TTC TCC -3'
FE	BV1-for-i-nest	5'-GGA GAA GAG AGA GCA AAA GG -3'
	Fe_BV1-BJ2.3-1	5'-ATA CTG CGT ATC CTT CCT CC -3'
	BV1-for-inner	5'-ATT CTC CGC ACA ACA GTT CC -3'
	Fe_BV1-nDn-in-impr	5'-TCC TTC CTC CCG CTA ATG C -3'

COP-1/17: Vβ-17-for-in 5'-GAA AGG AGA TAT AGC TGA AGG -3'
 COP-1/17β-rev-in 5'-TGT CCA AAG AAA GCT TCA AGG -3'

1.6.1.4 Universelle Primersets für die TZR-α-Ketten

Set a	Vα-4/1-for-in	5'-ACA GAA GAC AGA AAG TCC AGC -3'
	Vα-4/2-for-in	5'-GTC CAG TAC CTT GAT CCT GC -3'
	Vα-6-for-in	5'-GCA AAA TGC AAC AGA AGG TCG -3'
	Vα-8/1-for-in	5'-CAG TGC CTC AAA CTA CTT CC -3'
	Vα-8/2-for-in	5'-GCC TCA GAC TAC TTC ATT TGG -3'
	Vα-14-for-in	5'-ACA GAA TGC AAC GGA GAA TCG -3'
	Vα-24-for-in	5'-CCT TCA GCA ACT TAA GGT GG -3'
	Vα-28-for-in	5'-TCT CTG GTT GTC CAC GAG G -3'
Set b	Vα-2/1-for-in	5'-TGG AAG GTT TAC AGC ACA GC -3'
	Vα-2/2-for-in	5'-TGG AAG GTT TAC AGC ACA GG -3'
	Vα-5-for-in	5'-CAG CAT ACT TAC AGT GGT ACC -3'
	Vα-10-for-in	5'-TCA CTG TGT ACT GCA ACT CC -3'
	Vα-12-for-in	5'-TAC AAG CAA CCA CCA AGT GG -3'
	Vα-22-for-in	5'-AGG CTG ATG ACA AGG GAA GC -3'
	Vα-31-for-in	5'-GTG GAA TAC CCC AGC AAA CC -3'
	Set c	Vα-7-for-in
Vα-13-for-in		5'-TTA AGC GCC ACG ACT GTC G -3'
Vα-17-for-in		5'-CTG TGC TTA TGA GAA CAC TGC -3'
Vα-18-for-in		5'-CC TTA CAC TGG TAC AGA TGG -3'
Vα-21-for-in		5'-TGC TGA AGG TCC TAC ATT CC -3'
Vα-23-for-in		5'-GTG GAA GAC TTA ATG CCT CG -3'
Vα-32-for-in		5'-TCA CCA CGT ACT GCA ATT CC -3'
Set d		Vα-3-for-in
	Vα-11-for-in	5'-AGG GAC GAT ACA ACA TGA CC -3'
	Vα-15-for-in	5'-CCT CCA CCT ACT TAT ACT GG -3'
	Vα-19-for-in	5'-CCT GCA CAT CAC AGC CTC C -3'
	Vα-25-for-in	5'-AGA CTG ACT GCT CAG TTT GG -3'
	Vα-26-for-in	5'-CCT GCA TAT CAC AGC CTC C -3'
	Vα-29-for-in	5'-ACT GCA GTT CCT CCA AGG C -3'
	Set e	Vα-1/235-for-in
Vα-1/14-for-in		5'-CTG AGG AAA CCC TCT GTG C -3'
Vα-9-for-in		5'-ATC TTT CCA CCT GAA GAA ACC -3'
Vα-16-for-in		5'-TCC TTC CAC CTG AAG AAA CC -3'
Vα-20-for-in		5'-ACG TGG TAC CAA CAG TTT CC -3'
Vα-27-for-in		5'-ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG -3'
Vα-30-for-in		5'-CTC TTC ACC CTG TAT TCA GC -3'
Cα-rev-in		5'-AG TCT CTC AGC TGG TAC ACG -3'

1.6.1.5 Klonspezifische Primer für die TZR- α -Ketten:

PM16488 (V α 2.2)	16488V α 2.2-rev-spec 16488V α 2.2-for-spec	5'-TGG GCT CCC TGA CTC ATT G -3' 5'-CAC AGG TCG ATA AAT CCA GC -3'
PM16488 (V α 11)	16488 α 11-rev-spec	5'-CAA ACA TGA GTC TGG CAT TGG -3'
PM16488 (V α 20)	16488 α 20-rev-spec	5'-TTA GTT TGC CTG TGT TGC TAG -3'
PM16488 (V α 23)	16488 α 23-rev-spec	5'-GAT GTA TTT GTA GGT TCC TGA G -3'
IBM15551 (V α 4)	15551 α 4.2-rev-spec	5'-AGT TTG TTT CCA TAT ACT GAG GC -3'
IBM15551 (V α 23)	15551 α 23-rev-spec	5'-AAA GGT GAG CAT GTT GCC TG -3'
FE (V α 7.2)	Va7.2 Fe AV7.2J16-rev-2 Va7 Fe-2 Fe AV7.2J16-rev-3 Va7 Fe-3 Fe AV7.2J16-rev-4	5'-CAC GTA CCA GAC ATC TGG G -3' 5'-TTT AAC ATG GTY CCC CTT GC -3' 5'-TCC TGG TAC CAG CAA CAT GC -3' 5'-TTG CAA AGA GCA GCT CGA GG -3' 5'-GAT GGT TTG GAG GAG AAA GG -3' 5'-GCA GCT CGA GGT TAT CTC TC -3'

1.6.2 Primer für die TZR-Klonierung

1.6.2.1 Klonierung der TZR des Patienten PM16488

V β 1-J β 1.2:

C_BV1_SalI lead	5'-ACG CGT CGA CAT GGG CTT CAG GCT CCT C -3'
C_BV1_SacI rev	5'-TCC AGA GAG CTC AGG TTT AG -3'
C_BV1_SacI for	5'-AAC TAA ACC TGA GCT CTC TGG -3'
C_BV1_AflIII rev	5'-ACC GAA CGT GTA GCC ATA GAG -3'
C_BV1_AflIII for	5'-ACT CTA TGG CTA CAC GTT CGG -3'
C_BV1_BglIII rev	5'-TGC ACC TCC TTC CCA TTC AC -3'

V α 2.2-J α 54:

C_AV2_SalI lead	5'-ACG CGT CGA CAT GAT GAA ATC CTT GAG AGT TTT AC- 3'
C_AV2_BsrDI rev	5'-TTG TAC TCA TTG CAC AGA GGT AG -3'
C_AV2_BsrDI for	5'-ACC TCT GTG CAA TGA GTC AG -3'
C_AV2_PvuII rev	5'-AGT CTC TCA GCT GGT ACA CG -3'

V α 11-J α 31:

C_AV11_SalI lead 5'-ACG CGT CGA CAT GGC TTT GCA GAG CAC TCT G -3'
C_AV11_PstI rev 5'-TCC CGC ACC TGC AGG ATG AG -3'
C_AV11_PstI for 5'-TGC TCA TCC TGC AGG TGC -3'
C_AV11_SpeI rev 5'-TTC ACC ACT AGT TGA GTT CC -3'
C_AV11_SpeI for 5'-AAC TCA ACT AGT GGT GAA GCC -3'
C_AV11_PvuII rev 5'-AGC ACT GTT GCT CTT GAA GTC -3'

V α 20-J α 37:

C_AV20_SalI lead 5'-ACG CGT CGA CAT GAG GCA AGT GGC GAG AG -3'
C_AV20_PstI rev 5'-TCT GTC TGC AGG GAT AAA CAG -3'
C_AV20_PstI for 5'-TTT ATC CCT GCA GAC AGA AAG -3'
C α rev in 5'-AGT CTC TCA GCT GGT ACA CG -3'

1.6.2.2 Klonierung des TZR JM22

V β 17-J β 2.7:

JM22 Vbeta for 5'- CAT GTA CTG GTA CCG ACA GG -3'
JM22 VJbeta rev 5'- CCG AAG TAC TGC TCG TAG GAG CTC CTC GAA CTA
CTG GCA CAG AGA TAG AAA G -3'

V α 10-J α 42:

JM22 AV10 lead 5'- TGT GTC GAC ATG GTC CTG AAA TTC TCC GTG -3'
JM22 VJalpha rev 5'- TTG GGA TCC CGC TCC TGC ACA GAG GTA GTG GC -3'
JM22 Jalpha for 5'- GAG GGA TCC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA -3'

1.6.2.3 Primer für die Amplifikation der patientenspezifischen HLA-Moleküle

HLA-A02 for 5'- GTC CGG AGT ATT GGG ACG G -3'
HLA-A02 rev 5'- CAG GTA TCT GCG GAG CCA C -3'
HLA-A26 for 5'- TCC ATG AGG TAT TTC TAC ACC -3'
HLA-A26 rev 5'- CAG GTA TCT GCG GAG CCA C -3'
HLA-B08 for 5'- CCA CTC CAT GAG GTA TTT CG -3'
HLA-B08 rev 5'- CCT CCA GGT AGG CTC TGT C -3'
HLA-B38 for 5'- GGC TAC GTG GAC GAC ACG -3'
HLA-B38 rev 5'- CCC TCC AGG TAG GTT CTC A -3'
HLA-Cw07 for 5'- TCC ATG AGG TAT TTC GAC ACC -3'
HLA-Cw07 rev 5'- CCC TCC AGG TAG GCT CTC A -3'
HLA-Cw1203 for 5'- CCA TGA GGT ATT TCT ACA CCG -3'
HLA-Cw1203 rev 5'- CTG GGT GAT CTG AGC CGC C -3'

1.7 Antikörper

1.7.1 Primäre und direkt gekoppelte Antikörper

Antikörper	Spezifität	Isotyp und Herkunft	Hersteller
UCHT1	Mensch-CD3 FITC-gekoppelt	IgG1; Maus	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
145-2C11	Maus-CD3 ϵ FITC-gekoppelt	IgG1; Hamster	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
B9.11	Mensch-CD8 FITC-gekoppelt	IgG1; Maus	Beckman Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland
YTC182.20	Mensch-CD8	IgG2b; Ratte	Serotec
LT8	Mensch-CD8	IgG1; Maus	Serotec
2ST8.5H7	Mensch-CD8 PC5-gekoppelt	IgG2a; Maus	Beckman Coulter Immunotech
BL37.2	Mensch-TZR-V β 1	IgG1; Ratte	Beckman Coulter Immunotech
MPB2D5	Mensch-TZR-V β 2	IgG1; Maus	Beckman Coulter Immunotech
E17.5F3	Mensch-TZR-V β 17	IgG1; Maus	Beckman Coulter Immunotech
AF23	Mensch-TZR-V β 23	IgG1; Maus	Beckman Coulter Immunotech
6C8	IgG1 Isotypkontrolle FITC-gekoppelt	IgG1; Hamster	BD Pharmingen
7T4-1F5	IgG2a Isotypkontrolle PC5-gekoppelt	IgG2a; Maus	Beckman Coulter Immunotech
LODNP-1	IgG1 Isotypkontrolle	IgG1; Ratte	Beckman Coulter Immunotech
W6/32	Mensch HLA-ABC FITC-gekoppelt	IgG2a; Maus	Proimmune, Oxford, UK
BB7.2	Mensch HLA-A2 FITC-gekoppelt	IgG; Maus	Proimmune, Oxford, UK

1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Affe-anti-Kanninchen IgG-Cy3	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Affe-anti-Kanninchen IgG-Rhodamin	Jackson ImmunoResearch
Ziege-anti-Ratte IgG (H+L)-Cy3	Jackson ImmunoResearch
Ziege-anti-Ratte IgG-FITC	DAKO, Hamburg, Deutschland
Ziege-anti-Maus IgG-Cy3	Jackson ImmunoResearch
Ziege-anti-Maus IgG-FITC	DAKO, Hamburg, Deutschland
Schaf-anti-Ratte IgG-Biotin	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Ziege-anti-FITC IgG-Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

1.8 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Typ	Bezugsquelle; Referenz
58 α β ⁻	TZR ⁻ -Maus-T-Zellhybridom	Im Labor vorhanden (Letourner et al, 1989)
COP-1	TZR-Transfektante 58 α β ⁻ : V α 2.3 ⁺ V β 17 ⁺	Im Labor vorhanden (unpubliziert)
BBC-9	TZR-Transfektante 58 α β ⁻ : V α 22 ⁺ V β 9 ⁺	Im Labor vorhanden (Wiendl et al, 2002)
LTK ⁻ -Zellen	Maus-Fibroblastenzelllinie	ATCC
TE671	humane Rhabdomyosarkom Tumorzelllinie	ATCC
Autologe EBV-B- Zellen 16488	durch EBV immortalisierte B- Zellen des Patienten PM16488	selbst hergestellt durch K.Dornmair; virusproduzierende Zelllinie erhalten von Josef Mautner (GSF, Großhadern)

1.9 Allgemeine Puffer und Lösungen

DEPC-behandeltes Wasser:	0,1 % DEPC wird in Wasser gelöst, über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Die zur Färbung verwendeten Puffer wurden in DEPC-H ₂ O angesetzt.
10 x PBS:	1,5 M NaCl 84 mM Na ₂ HPO ₄ 19 mM NaH ₂ PO ₄
10x TBS-Puffer:	100 mM Tris 1,4 M NaCl → 1 x TBS-Lösung einstellen auf pH 7.2-7.4
10x TBE-Puffer:	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA (pH 8.0)
6 x DNA-Ladungspuffer	50% Glycerin 0,02% Bromphenolblau 0,02% Xylenblau 10mM Tris (pH 7.5) H ₂ O

1.10 Zellkultur-Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
<u>Komplettmedium:</u>	
500ml RPMI 1640 + L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10% Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
1% Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml)	Invitrogen
1% MEM Non essential aminoacids (100x)	Invitrogen
1% MEM Natriumpyruvat (100mM)	Invitrogen
1 x PBS (CaCl ₂ , MgCl ₂)	Invitrogen
Trypsin/EDTA (1x)	Invitrogen
Propidiumjodid	Sigma
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Genicitinsulfat G418	Invitrogen
Hygromycin B in PBS (50mg/ml)	Invitrogen
Puromycin	Sigma Aldrich

1.11 Kits und spezielle Reagenzien

Produktbezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
QIAGEN One-Step-RT-PCR-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Einzelzell-RT-PCR
Qiagen Maxi-Kit	Qiagen GmbH	Plasmidisolierung
GFX TM Mikro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia	Plasmidisolierung
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH	Plasmidisolierung
SuperScript TM III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	cDNA-Synthese
Easy Pure DNA-Purification Kit	Biozym	Isolierung von DNA
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen GmbH	Reinigung von DNA
Dye-Ex Spin-Kit	Qiagen GmbH	Reinigung von Sequenzierungsproben
LSAB2 System alkaline phosphatase kit	DAKO, Hamburg, Deutschland	AP-Färbung
Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA	IL-2 ELISA
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen	RNA-Isolierung
Lipofectamin 2000	Invitrogen	Transfektion

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 Anzucht von Bakterienkulturen

2.1.1 Bakterienwachstum auf Agarplatten

Das angesetzte LB/Agar-Medium wurde autoklaviert und bei einer Temperatur von etwa 60°C das gewünschte Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration zugegeben (Ampicillin: 100µg/ml). Der flüssige Agar wurde in Plastikpetrischalen gegossen, so dass der Boden gut bedeckt war und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Zur Anzucht der Bakterien auf den Agarplatten beispielsweise nach einer Transformation wurden 20–200µl der Bakteriensuspension auf die Agarplatte pipettiert und mittels eines abgeflamnten Drigalski-Spatels gleichmäßig verteilt. Das Ausplattieren sollte sofort nach dem Auftragen der Suspension erfolgen, um eine Diffusion in den Agar zu vermeiden. Die Petrischale wurde über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Platten mit den gewachsenen Kolonien konnten bei 4°C einige Tage gelagert werden.

LB-Agar (1l)	15 g	Bacto-Agar
	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Yeast-Extract
	10 g	NaCl

2.1.2 Vermehrung von Bakterien über Flüssigkulturen

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte isoliert und in ein Falconröhrchen oder einen autoklavierten Kolben überführt. Das Falconröhrchen bzw. der Kolben enthielt LB-Medium, das mit Antibiotikum in der erforderlichen Konzentration versetzt wurde (Ampicillin: 100µg/ml). Das Antibiotikum diente der Selektion und garantierte, dass nur die Bakterien wuchsen, die auch die richtige Plasmid-DNA enthielten. Die angeimpften Kulturen wurden über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

LB-Medium (1l)	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Yeast-Extract
	10 g	NaCl

2.1.3 Konservierung von Bakterienstämmen

Glycerin-Stocks dienen dazu Bakterienstämme zu konservieren. Hierzu wurden 800µl einer frisch angezüchteten Bakterienkultur mit 200µl 87% Glycerin in einem Einfrierröhrchen gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 20ml LB-Medium mit dem Bakterienstamm DH5αF'IQ angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2x500ml LB-Medium mit je 6ml der angezüchteten Vorkultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler solange inkubiert bis diese eine optische Dichte von ca. 0,5 bei einer Wellenlänge von 600nm erreichten. Die Kulturen wurden 30min auf Eis abgekühlt und anschließend 15min bei 4000rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Resuspension des Bakteriensediments in 1000ml eiskaltem 10%igem Glycerin wurden die Bakterien erneut 15min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde nun in 500ml 10%igem Glycerin resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde nun in 20ml 10%igem Glycerin aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach abschließender Resuspension in 2ml 10%igem Glycerin wurden Aliquots von je 50µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort auf Trockeneis gelagert. Die endgültige Lagerung der nun elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

Zum Überprüfen der Qualität der Zellen wurde ein Aliquot mit 0,1ng des Kontrollvektors pUC19 elektroporiert und 100µl, 10µl bzw. 1µl auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten ausgezählt und die Transfektionseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformanden im Gesamtansatz: } \frac{\text{Kolonienzahl} \times 1050 \mu\text{l}}{\text{ausplattierte } \mu\text{l}}$$

$$\text{Transformationsrate: } \frac{\text{Transformanden im Ges.ansatz}}{\mu\text{g eingesetzte DNA}}$$

Die Transfektionseffizienz sollte bei mind. $1 \times 10^8 / \mu\text{g DNA}$ liegen.

2.2.2 Elektroporation

Die für die Elektroporation hergestellten Bakterien DH5 α F'IQ wurden 10min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1-2 μ l Plasmid-DNA zu den Bakterien pipettiert, in eine vorgekühlte Transformationsküvette (0,2cm von BioRad) überführt und mit 2,5kV, 200 Ω , 25 μ F elektroporiert. Hierdurch öffnen sich Poren in den Bakterienzellwänden durch die die DNA in die Zelle eindringen kann. Die Zellsuspension wurde mit 1ml LB-Medium ohne Antibiotikum verdünnt und in ein Falcon überführt. Nach einer Inkubation von 30min bis 1h bei 37°C im Schüttler wurden 20 μ l, 50 μ l bzw. 200 μ l der elektroporierten Bakterienzellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

2.3 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte mit dem Qiagen Maxi-Kit. Hierzu wurden 250ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit Bakterien von einer Agarplatte oder einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension 10min bei 5000rpm und 4°C abzentrifugiert und das Sediment in 10ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10ml Lysispuffer P2 hinzugefügt und nach vorsichtigem Invertieren 5min bei RT inkubiert, um eine vollständige Lyse der Bakterienzellen zu gewährleisten. Nach Zugabe von 10ml Neutralisationspuffer P3 und vorsichtigem Invertieren, wurde das Gemisch 30min auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert. Das Abtrennen der nun lysierten Bakterien erfolgte durch 30minütiges Zentrifugieren bei 10.000rpm und 4°C. Der Überstand, der die gewünschte Plasmid-DNA enthielt, wurde nun auf eine vorher mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule überführt. Die DNA bindet beim Durchlauf an die Säulenmembran. Zum Waschen der Plasmid-DNA wurden zweimal je 30ml des Waschpuffers QC auf die Säule gegeben und anschließend die DNA mit 15ml Elutionspuffer QF in ein Glaszentrifugationsröhrchen eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 11ml Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Nach anschließender Zentrifugation für 30min bei 10.000rpm und 4°C wurde die DNA mit 80% Ethanol gewaschen und erneut 15min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Trocknen des DNA-Sediments wurde diese in 200 μ l EB-Puffer resuspendiert. Um eine ausreichende Sauberkeit der DNA zu gewährleisten, wurde die DNA nach dem Lösen nochmals 5min bei 14.000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Spektrophotometers GeneQuant II wie unter II.2.3.3 beschrieben bestimmt.

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke

Die Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen erfolgte entweder mit Hilfe des GFXTM Mikro Plasmid Prep Kit von Amersham Pharmacia oder des QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN.

Für den GFXTM Mikro Plasmid Prep Kit wurden 3ml LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, mit einer isolierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2ml der herangewachsenen Bakterienkultur in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugieren für 30sec bei 14.000rpm sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 150µl Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert und die Bakterien anschließend durch 150µl Lösung 2 lysiert. Nach Zugabe von 300µl Lösung 3 wurde das Gemisch 5min bei 14.000rpm zentrifugiert, um die präzipitierten Bestandteile abzutrennen und der Überstand auf eine GFX-Säule überführt. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule 30sec bei 14.000rpm zentrifugiert und anschließend mit 400µl Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die an die Säulenmembran gebundene Plasmid-DNA mit 50-100µl EB-Puffer in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Um eine vollständige Elution der DNA zu gewährleisten, wurde die Säule vor dem abschließenden Zentrifugationsschritt 1min bei RT inkubiert.

Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Spektrophotometers GeneQuant II wie nachfolgend beschrieben bestimmt.

Die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN erfolgte auf ähnliche Art und Weise. Nach Abzentrifugieren von 2ml angezüchteter Bakterienkultur wurde das Bakteriensediment in 250µl Resuspensionspuffer P1 gelöst, anschließend mit 250µl Lysispuffer P2 versetzt und nach vorsichtigem Invertieren mit 350µl Neutralisationspuffer N3 gemischt. Die Bakterienbestandteile wurden nun 10min bei 13.000rpm sedimentiert, der Überstand auf eine Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Nach Waschen der Säule mit 500µl PE Puffer und 750µl PB Puffer wurde die DNA mit 50µl EB-Puffer eluiert und die Konzentration mit Hilfe des Spektrophotometers bestimmt.

2.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde photometrisch durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen, bei der das Absorptionsmaximum von einzel- und doppelsträngiger DNA liegt. Die Konzentration der unterschiedlichen Nukleinsäurearten berechnet sich aus den Absorptionen bei 260nm unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors.

Die Messung wurde mit dem Spektrophotometer GeneQuant II von Amersham-Pharmacia durchgeführt.

2.4 Präzipitation von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

2.4.1 Präzipitation durch Pellet Paint

Zum Präzipitieren von Plasmid-DNA sowie von PCR-Produkten mittels Pellet Paint Co-Precipitant von Novagen wurden 2µl Pellet Paint in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und die gewünschte Menge PCR-Produkt zugegeben. Anschließend wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH5.2) sowie 2 Volumen 100% Ethanol hinzugefügt und durch kurzes Vortexen gemischt. Nach 2minütiger Inkubation bei RT wurde das Gemisch 5min bei 14.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Sediment war durch das rot gefärbte Pellet Paint deutlich zu erkennen. Das Sediment wurde nun einmal mit 200µl 80% Ethanol und anschließend mit 200µl 100% Ethanol gewaschen und beide Male 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach 10-15minütigem Trocknen wurde die DNA in einem geeigneten Volumen EB-Puffer resuspendiert.

2.4.2 Präzipitation durch Natriumacetat / Ethanol

Zum Präzipitieren von Plasmid-DNA durch Natriumacetat / Ethanol wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH5.2) sowie 2,5 Volumen 100% Ethanol zur gewünschten DNA gegeben und durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Die Proben wurden anschließend für mindestens 30min bei -80°C inkubiert, um eine vollständige Präzipitation zu gewährleisten. Die Proben konnten jedoch auch bis zum Gebrauch länger bei -80°C gelagert werden.

2.5 Gesamt-RNA-Isolierung und cDNA-Herstellung aus eukaryotischen Zellen

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurden 0,3 bis 2×10^6 Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen bei -80°C eingefroren. Zuerst wurden die Zellen in 500 μl Trizol-Reagenz von Invitrogen, das zuvor auf Raumtemperatur gebracht wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5min bei RT wurden 100 μl Chloroform hinzugefügt, durch kräftiges Schütteln gemischt und nach weiteren 2-3min Inkubation für 15min bei 11.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war eine Trennung der Phasen deutlich zu erkennen. Die obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA besser sichtbar zu machen, wurde je 1 μl Glycogen hinzugefügt. Zum Präzipitieren der RNA wurden 250 μl 2-Propanol (Isopropanol) zugegeben und nach kräftigem Schütteln für 10min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10min bei 11.000rpm bei 4°C wurde der Überstand vollständig abgenommen. Zum Waschen der RNA wurden 500 μl 75% Ethanol hinzugefügt, nach kurzem Vortexen für 5min bei 7.000rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Nach Trocknen der RNA für 5-10min wurde diese in 10 μl DEPC- H_2O resuspendiert und anschließend durch 10minütiges Erhitzen auf $55-60^\circ\text{C}$ vollständig gelöst. Die RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

Bei einer Zellmenge von über 2×10^6 wurde die Menge an eingesetztem Trizol, Chloroform, Isopropanol und Ethanol jeweils verdoppelt.

2.5.2 Erststrang cDNA-Synthese durch reverseTranskription von mRNA

Zum Umschreiben der isolierten mRNA in cDNA wurde das SuperScriptTM III Reverse Transkriptase-Kit von Invitrogen verwendet. Hierzu wurden ca. 1 μg RNA mit 1 μl Oligo (dT)12-18 (20ng/ μl) gemischt und mit DEPC- H_2O auf 12 μl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10min bei 65°C wurden 1 μl 10mM dNTP-Mix, 2 μl 0,1M DTT sowie 4 μl 5xFirst Strand Buffer hinzugefügt und 2min bei 45°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl Superscript III RNaseH⁻ Reverse Transkriptase wurden die Proben weitere 60min bei 45°C inkubiert.

2.6 Gelelektrophoretische Analyse von DNA

2.6.1 Analyse von DNA in Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Proben und Bestimmung ihrer Größe. Analytische Gele dienen dazu, die Größe von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau oder nach einer PCR-Reaktion zu überprüfen. Mittels präparativer Gele wurden DNA-Fragmente definierter Größe von DNA-Fragmenten abweichender Größe abgetrennt und anschließend aus dem Agarosegel isoliert.

Beim Anlegen von elektrischem Strom wandern die aufgrund ihres Desoxyribose-Phosphat-Rückgrates negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode. Ihre Laufgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molargewichts (Einheit: kb → Längeneinheit; 1 kb entspricht 1000 Basen(paaren) eines einzel(doppel)strängigen Nucleinsäuremoleküls; 1 kb besitzt eine Länge von 0,34 µm und eine Masse von ca. 660 kD). Auch durch die Porengröße des Agarosegels wird die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im elektrischen Feld beeinflusst. Sind die Moleküle im Verhältnis zum Durchmesser der Poren klein, wandern sie schneller vorwärts als größere Moleküle. So wird eine exakte Auftrennung der DNA-Fragmente gewährleistet.

Die Agarose (Biozym) wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Sowohl der Agarose als auch dem Laufpuffer wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 5 µg/ml). Durch die Zugabe von Ethidiumbromid konnte die aufgetrennte DNA unter dem UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die Helices der DNA und färbt diese spezifisch an. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge: 320 nm) beginnt der Farbstoff zu fluoreszieren und die DNA ist für das Auge sichtbar. Das Ethidiumbromid im Laufpuffer ermöglichte zusätzlich eine Detektion relativ geringer DNA-Mengen.

Die DNA-Proben wurden mit 1/6 6x DNA-Ladungspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Auftragspuffer erleichterte zum einen das Absinken der Proben in die Geltaschen, des Weiteren beinhaltete er zwei Farbstoffe (Xylencyanol und Bromphenolblau), die es ermöglichten, den Elektrophoreseverlauf zu verfolgen und die Elektrophorese rechtzeitig abzustoppen. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe des Gels bei 90-180V.

2.6.2 DNA-Größenstandards

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden parallel zu den DNA-Proben DNA-Größenstandards aufgetragen.

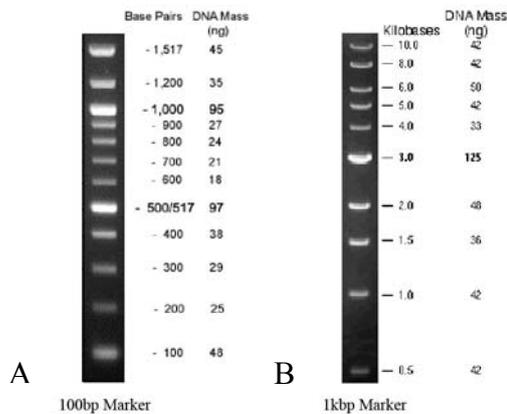


Abb. 7: DNA-Größenstandards von New England Biolabs
A: 100bp-Marker
B: 1kbp-Marker

2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das Easy Pure DNA-Purification Kit von Biozym verwendet. Hierzu wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Ein mg Agarosegel entsprach einem Volumen von 1µl. Zum Gelstück wurden nun 0,5 Volumen MELT sowie 2,5 Volumen SALT hinzugefügt, durch Vortexen gemischt und bei 55°C solange inkubiert bis sich das Gelstück vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde entsprechend der zu erwartenden Menge an DNA 5-10µl BIND (+1µl/µg zu erwartender DNA-Menge) zugegeben und durch kurzes Schütteln gut gemischt. Nach einer 5minütigen Inkubation bei RT wurde das Gemisch für 15sec bei 14.000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde anschließend mit 1ml Waschpuffer gewaschen und nach erneuter 5minütiger Inkubation kurz zentrifugiert. Das Sediment wurde 5-10min bei 40°C getrocknet und dann je nach DNA-Menge in 10-50µl EB-Puffer gelöst.

2.6.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Zur schnellen Abtrennung von Enzymen, Nukleotiden und Primern von DNA-Fragmenten oder zur Umpufferung wurde der QIAquick PCR-Purification-Kit (Qiagen) eingesetzt. Die DNA-Probe wurde zunächst mit dem 5-fachen Volumen PB Puffer gemischt, auf die QuickSpin Säule gegeben, die ein maximales Fasungsvermögen von 10µg DNA besaß, und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach Waschen mit 750µl PE Puffer und erneuter

Zentrifugation wurde die DNA mit 50µl EB Puffer eluiert und konnte nun in weitere Reaktionen eingesetzt werden.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.7.1 Amplifizierung von DNA-Sequenzen über PCR

Die PCR ist eine Methode zur gezielten Amplifikation eines ausgewählten Nukleinsäurebereichs, der durch zwei Oligonukleotide (Primer) eingegrenzt wird. Temperaturstabile DNA-Polymerasen, wie z.B. die Taq-DNA-Polymerase aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“ gestatten auf einfache Weise die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und Denaturierungszyklen der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge.

Die Auswahl der Primer ist sehr wichtig für den Erfolg einer PCR-Reaktion. Die Schmelztemperatur der beiden Primer sollte ähnlich sein und über 50°C liegen, da eine zu niedrige Schmelztemperatur zu einer unspezifischen Bindung der Primer und somit auch zu einem unspezifischen PCR-Produkt führen kann. Zur Berechnung der Schmelztemperatur gilt folgende Regel:

$$T_M = 4 \times \sum(G, C) + 2 \times \sum(A, T)$$

Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur und sollte ca. 5°C darunter liegen.

Ferner ist darauf zu achten, dass die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren und nur an eine DNA-Sequenz binden können, da dies den Erfolg der Reaktion herabsetzen würde.

Standard PCR-Ansatz:

DNA	1	µl
dNTP Mix (10mM)	0,25	µl
Primer for (100pmol/µl)	0,25	µl
Primer rev (100pmol/µl)	0,25	µl
10xPCR-Puffer (15mM mit MgCl ₂)	2	µl
DNA-Polymerase (5U/µl)	0,25	µl
dH ₂ O	13	µl
	20	µl

Nach der PCR-Reaktion wurden die Ansätze mit 1/6 Volumen 6x Auftragungspuffer versetzt und auf einem 1-2% Agarosegel der Erfolg der PCR-Reaktion überprüft.

Standard PCR-Programm:

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Anfangsdenaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	1
3. Annealing	abhängig von den Primerpaaren	1
4. Elongation	72	abhängig von der Produktgröße
5. Auffüllen	72	10

Schritte 2-4 wurden 25-30x wiederholt.

2.7.2 In-vitro-Mutagenese über PCR

Die PCR-Reaktion wurde in einigen Fällen dazu benutzt, Nukleotidsequenzen gezielt zu verändern und so in die amplifizierte DNA-Sequenz stille Mutationen einzufügen. Durch dieses Verfahren konnten neue Restriktionsschnittstellen in die DNA-Sequenz eingefügt oder gezielt vorhandene Restriktionsschnittstellen zerstört werden. Die Aminosäureabfolge, die durch diese Sequenz kodiert wurde, wurde dabei jedoch nicht verändert. Die hierzu eingesetzten Oligonukleotide waren größtenteils mit der Zielsequenz komplementär, nur ausgewählte Nukleotide wurden verändert.

2.7.3 Einzelzell-RT-PCR

Eine in dieser Arbeit entwickelte Sonderform der PCR stellt die Einzelzell-RT-PCR dar. Diese wurde dazu verwendet, spezifisch die DNA der beiden T-Zell-Rezeptor-Ketten einer einzelnen T-Zelle, zu analysieren. Hierzu wurde das Qiagen One-Step-RT-PCR-Kit verwendet.

Zur Analyse wurden Zellen eingesetzt, die mittels Lasermikrodissektion (II.3.4) aus Biopsiematerial oder Cytospins (II.3.2) isoliert wurden. Die Einzelzell-RT-PCR erfolgte in vier Teilreaktionen. In der RT-Reaktion wurde die mRNA der isolierten Zelle zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer ersten Amplifikationsrunde beide Ketten des T-Zell-Rezeptors (TZR) voramplifiziert. In der zweiten Amplifikationsrunde wurde zunächst nur die β -Kette des TZR amplifiziert und nur die β -positiven Proben weiter auf eine mögliche α -Kette untersucht.

Da sich die Zellen nach der Isolation mittels Lasermikrodissektion im Deckel des PCR-Reaktionsgefäß befanden, wurden je 20 μ l RT-Reaktionsmix für die RT-Reaktion in den Deckel pipettiert und durch Zentrifugation in das Reaktionsgefäß gebracht. Die Proben wurden 30min bei 50°C in einem PCR-Thermocycler inkubiert.

RT-Reaktionsmix (für 100 Reaktionen):

5x Qiagen One-Step-RT-PCR Puffer	400,0	µl
H ₂ O RNase frei (Qiagen)	1405,0	µl
RNase out (Invitrogen)	10,0	µl
dNTP (10mM, Qiagen)	80,0	µl
Cα RT (100pmol/µl)	12,5	µl
Cβ RT (100pmol/µl)	12,5	µl
Qiagen One-Step-RT-PCR Enzyme Mix	80,0	µl
	2000,0	µl

Anschließend wurden 5µl Reaktionsmix für die αβ-Voramplifikation direkt zur RT-Reaktion gegeben und erneut im PCR-Thermocycler inkubiert.

αβ-Voramplifikation (für 100 Reaktionen):

5x Qiagen One-Step-RT-PCR Puffer	100	µl
H ₂ O RNase frei (Qiagen)	270	µl
dNTP (10mM, Qiagen)	20	µl
Cα rev out (100pmol/µl)	15	µl
Vα pool gesamt	45	µl
Vβ X for out (100pmol/µl)	15	µl
Pat Y β rev out (100pmol/µl)	15	µl
Qiagen One-Step-RT-PCR Enzyme Mix	20	µl
	500	µl

PCR-Programm:

1.		94°C	2min
2.	4x	[94°C, 61°C, 72°C]	jeweils 1min
3.	4x	[94°C, 58°C, 72°C]	jeweils 1min
4.	4x	[94°C, 56°C, 72°C]	jeweils 1min
5.	40x	[94°C, 53°C, 72°C]	jeweils 1min
6.		72°C	10min

Ohne eine Analyse auf dem Agarosegel wurde je 1µl des Reaktionsgemisches in die nachfolgende β-PCR-Reaktion eingesetzt. Bei dieser Reaktion handelte es sich um eine doppel-nested PCR, da beide Primer für die β-Ketten innerhalb der Primer der αβ-Voramplifikation lagen. Es wurden jeweils 19µl Reaktionsgemisch mit 1µl der αβ-Voramplifikation versetzt und mit dem gleichen PCR-Programm amplifiziert.

β -Amplifikation (für 100 Reaktionen):

10x PCR Puffer (Boeringer)	200	μ l
dH ₂ O	1635	μ l
dNTP (10mM)	20	μ l
V β X for in (100pmol/ μ l)	10	μ l
Pat Y β rev in (100pmol/ μ l)	10	μ l
Taq DNA Polymerase (Boeringer)	25	μ l
	1900	μ l

Die PCR-Ansätze wurden anschließend auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die erhaltenen DNA-Fragmente durch Sequenzieren (II.2.9) überprüft. Nur die Zellen, die die korrekte TZR- β -Kette zeigten, wurden dann in die α -PCR-Reaktion eingesetzt. Aufgrund der großen Menge an Primern, die für die Amplifikation aller theoretisch möglichen TZR- α -Ketten benötigt wurden, wurden für jede positive β -Kette fünf Einzelreaktionen durchgeführt. Jede Einzelreaktion enthielt ein V α -Primer Set a-e mit je 7-8 V α -Primern. Hierzu wurden erneut je 1 μ l des Reaktionsgemisches aus der $\alpha\beta$ -Voramplifikation mit 19 μ l PCR-Mix gemischt und mit demselben PCR-Programm analysiert.

α -Amplifikation (für 15 Reaktionen):

10x PCR Puffer (Boeringer)	30,0	μ l
dH ₂ O	232,5	μ l
dNTP (10mM)	3,0	μ l
C α rev in (100pmol/ μ l)	1,5	μ l
V α Primer Set a, b, c, d oder e	15,0	μ l
Taq DNA Polymerase (Boeringer)	3,0	μ l
	285,0	μ l

Anschließend wurden die PCR-Ansätze auf einem Gel analysiert und auftretende DNA-Banden ebenfalls sequenziert.

2.8 Klonierung

2.8.1 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix erkennen und beide Stränge der Helix an spezifischen Stellen schneiden. Dadurch werden Phosphodiesterbindungen gelöst.

Die Spaltung von DNA in wässrigen Lösungen wurde in den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen und unter den empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die meisten

Spaltungen erfolgten 1-2h bei 37°C. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Menge an eingesetztem Enzym 1/10 des Gesamtansatzes nicht überschritt, um die Enzymaktivität durch das im Enzym-Stock enthaltene Glycerin nicht zu beeinträchtigen. Es wurden sowohl Einzel- als auch Doppelspaltungen sowohl für analytische als auch präparative Zwecke durchgeführt. Bei Doppelspaltungen mit Enzymen, die nicht in kompatiblen Puffersystemen arbeiteten, wurde die DNA nach dem ersten Verdau durch Fällung mit Pellet Paint (II.2.4.1) gereinigt und anschließend der zweite Verdau durchgeführt. Der Erfolg der Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft.

	<u>Analytischer Verdau</u>	<u>Präparativer Verdau</u>
DNA	1 µg	5 µg
10x Restriktionspuffer	1 µl	5 µl
Restriktionsenzym	1 Einheit	10 Einheit
dH ₂ O	add 10 µl	add 50 µl

2.8.2 Ligation von DNA-Molekülen

Bei einer Ligation werden zwei DNA-Fragmente (z.B. linearisierter Vektor und Gen-Fragment), die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurden, durch die T4-DNA-Ligase miteinander verbunden. Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Fragments.

Das Verhältnis der eingesetzten Fragmentmoleküle und des linearisierten Vektors sollte mindestens 3:1 betragen, um den Erfolg der Ligation zu gewährleisten.

Ligationsansatz:

Linearisierte Vektor-DNA	50-100 ng
DNA-Fragment im entsprechenden molaren Verhältnis	
T4 DNA-Ligase	1 µl
5x T4 DNA-Ligase-Puffer	4 µl
dH ₂ O	add 20 µl

Alle Ligationen erfolgten über Nacht bei 16°C und wurden mit der T4 DNA-Ligase und dem vom Hersteller empfohlenen T4-Ligase-Puffer durchgeführt. Am folgenden Tag wurde der Ligationsansatz in elektrokompente DH5αF'IQ-Bakterienzellen transformiert (II.2.2.2) und auf Agarplatten ausplattiert.

Um sicher zu gehen, dass der eingesetzte Vektor mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten wurde und somit zwei verschiedene Schnittstellen aufwies, wurde eine Kontrollligation (Eigenligation) ohne DNA-Fragment durchgeführt. Wurde der Vektor zweimal geschnitten,

konnte dieser durch die Ligase nicht wieder zusammengefügt werden, was ein Wachstum auf den antibiotikahaltigen Agarplatten verhinderte. Die Eigenligation erfolgte ebenfalls über Nacht bei 16°C.

2.9 Sequenzierung

Um die Nukleotidsequenz amplifizierter DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden die DNA-Proben sequenziert. Die Analyse großer DNA-Fragmente wurde meist durch die Firma Medigenomix (Martinsried) durchgeführt. Kleine DNA-Fragmente konnten selbst sequenziert werden.

Hierzu wurde das PCR-Produkt zunächst in einer Voramplifikationsreaktion vermehrt.

Reaktionsansatz:

PCR-Produkt	1,0	µl
10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	5,0	µl
dNTP (20mM)	0,5	µl
Primer for (10pmol/µl)	2,5	µl
Primer rev (10pmol/µl)	2,5	µl
AmpliTaq Gold (5U/µl)	0,2	µl
H ₂ O	38,3	µl
	50,0	µl

PCR-Programm:

1.	1x	94°C	6min
2.	24x	[94°C, 59°C, 72°C]	jeweils 1min
3.	1x	72°C	7min

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, um Primer und eventuell noch vorhandenen Nukleotide zu entfernen (II.2.6.4) und ein Teil des aufgereinigten Eluats in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Eluat aus Aufreinigung	4,0	µl
Big Dye Terminator VS.1.1	4,0	µl
Puffer +	2,0	µl
Primer for oder rev (10pmol/µl)	1,0	µl
DEPC-H ₂ O	4,0	µl
	15,0	µl

PCR-Programm:

1.	96°C	30 sec
2.	55°C	15 sec
3.	60°C	4 min

Die Schritte 1-3 wurden 25mal wiederholt.

Die Proben wurden nun nach erneuter Aufreinigung mit dem Dye-Ex Spin-Kit (Quiagen) für das Gel vorbereitet und mithilfe des ABI 377 Sequenzers der Firma Applied Biosystems und einem hochauflösenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben mit dem Programm Sequencing Analysis 3.4.1 der Firma Applied Biosystems analysiert.

2.10 CDR3-Spectratyping

Das CDR3-Spectratyping wurde verwendet, um die TZR- β -Ketten der Gesamt-T-Zell-Population im Zielgewebe eines Patienten zu untersuchen und mögliche expandierte TZR- β -Ketten zu detektieren. Hierzu wurden entweder eine ausreichende Menge Muskel- bzw. Hirngewebe von einem Biopsieblock geschnitten (ca. 20-30 Schnitte je 10 μ m) oder CD8⁺ T-Lymphozyten aus Blut des Patienten isoliert. Hieraus wurde die Gesamt-RNA gewonnen und diese in cDNA umgeschrieben (II.2.5), die dann in den CDR3-Spectratype eingesetzt werden konnte.

In einer ersten PCR-Runde wurde die cDNA mit 25 verschiedenen V β -Primern gegen einen C β -spezifischen Primer amplifiziert.

Reaktionsansatz erste PCR Runde:

cDNA	1,0 μ l
10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	5,0 μ l
dNTP (20mM)	0,5 μ l
C β Primer (1:10)	2,5 μ l
V β Primer (V β _i =25), jeweils	2,5 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	38,3 μ l
	<hr/>
	50,0 μ l

PCR-Programm:

1.	1x	94°C	6min
2.	40x	[94°C, 59°C, 72°C]	jeweils 1min
3.	1x	72°C	7min

Anschließend wurden die Produkte geteilt und in eine zweite PCR-Reaktion („run off“-Reaktion) mit jeweils 13 verschiedenen, fluoreszenzmarkierten, J β -spezifischen Primern eingesetzt.

Reaktionsansatz zweite PCR Runde „run off“:

PCR-Produkt aus erster Runde	2,0	μ l
10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	1,0	μ l
dNTP (20mM)	0,1	μ l
J β -Primer, fluoreszenzmarkiert, jeweils	5,0	μ l
Taq Polymerase	0,04	μ l
H ₂ O	1,86	μ l
	10,0	μ l

PCR-Programm:

1.	94°C	10min
2.	94°C	1min
3.	59°C	1min
4.	72°C	10min

Die Schritte 2-4 werden 5x wiederholt.

Die erhaltenen Produkte unterschiedlicher Länge wurden nun mithilfe des ABI 377 Sequenzers der Firma Applied Biosystems und einem hochauflösenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Programm Genescan 3.1.2 der Firma Applied Biosystems analysiert.

Ist eine TZR- β -Kette einer betrachteten Subfamilie polyklonal im Patienten vorhanden, stellen die Längen der einzelnen V β -J β -PCR-Produkte eine Gauss'sche Normalverteilung dar. Bei einer monoklonalen Expansion ist ein eindeutiger Peak im Spektratyp erkennbar, was auf ein stark dominierendes Produkt definierter Länge hindeutet. Um die Monoklonalität eindeutig zu beweisen, wurden solche Peaks durch Sequenzierung nochmals analysiert. Das Schema eines solchen CDR3-Spektratyps ist in Abb. 8 dargestellt.

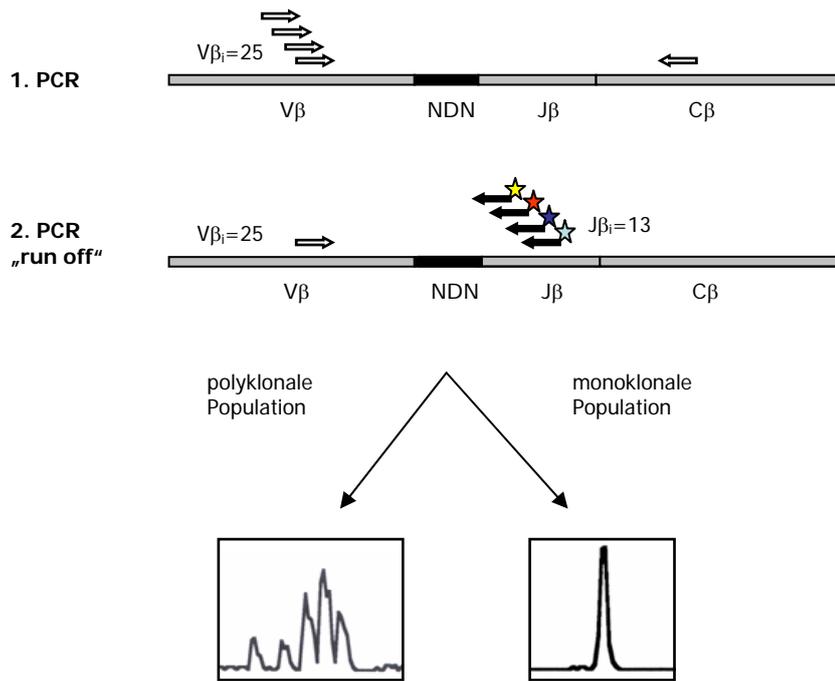


Abb. 8: Schema des CDR3-Spektrotypings

Im ersten Schritt wird die cDNA mit 25 verschiedenen V β -Primern gegen einen C β -spezifischen Primer amplifiziert. Anschließend werden die Produkte geteilt und in eine zweite PCR-Reaktion („run off“-Reaktion) mit jeweils 13 verschiedenen, fluoreszenzmarkierten, J β -spezifischen Primern eingesetzt. Die unterschiedlich langen Produkte werden in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei einer polyklonalen Population tritt eine Gauss'sche Normalverteilung auf, bei einer monoklonalen Population ein einzelner Peak.

3. Isolation von Einzelzellen aus Gefrierschnitten

3.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Um einzelne T-Zellen aus Biopsiegewebe isolieren zu können, wurden 10 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf spezielle folienbeschichtete Objektträger (Palm Mikrolaser) aufgebracht. Ein Aufrauen der Folienoberfläche und somit eine bessere Haftung der Schnitte wurde durch eine 30minütige Bestrahlung mit UV-Licht erreicht. Nach einer gründlichen Säuberung des Cryotoms CM3050 von Leica wurden die Biopsieblöcke mit Hilfe eines Einbettmediums auf den Präparathalter aufgefroren und durch Justieren in eine geeignete Schneidposition gebracht. Anschließend wurden 10 μ m dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf die vorbereiteten Objektträger aufgebracht und sofort auf Trockeneis, später bei -80°C gelagert.

3.2 Aufbringen von Zellen auf Objektträger mittels Cytospin

Durch das Aufbringen von Zellen auf Objektträger mittels Cytospin können Zellen anschließend leicht durch Lasermikrodissektion einzeln isoliert und analysiert werden. Hierzu wurden die Zellen gewaschen und in PBS mit 1% BSA aufgenommen. Die Konzentration

betrug etwa 750.000 Zellen/ml. Je 100µl Zellsuspension wurden anschließend in spezielle Gefäße ähnlich einem PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und in einen speziellen Zentrifugeneinsatz gesteckt. Die Gefäße wiesen unten eine kleine Öffnung auf durch die die Zellen beim nachfolgenden Zentrifugieren (8min bei 500rpm) nach und nach auf den Objektträger abgegeben werden konnten. Das Isolieren der Zellen erfolgte dann mittels der unter II.3.4 beschriebenen Methode der Lasermikrodissektion.

3.3 Immunhistologie

3.3.1 Alkalische Phosphatase Färbung (AP-Färbung)

Um expandierte T-Zellen in den Biopsieschnitten der untersuchten Patienten spezifisch anzufärben und sie anschließend durch Lasermikrodissektion zu isolieren, wurden immunocytochemische Färbungen durchgeführt. Die auf Folienobjektträger aufgebrauchten Gewebeschnitte wurden für 10min bei RT getrocknet und anschließend für 1min in -20°C kaltem Aceton fixiert. Nach dreimaligem Waschen in 1xTBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 2% Ziegen Serum in TBS für 15min blockiert. Anschließend wurde das Gewebe mit dem jeweiligen Primärantikörper gegen die Vβ-Region 40min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der Erstantikörper mittels LSAB2-System alkaline phosphatase Kit von DAKO detektiert. Hierzu wurde das Gewebe mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten AK für 15min inkubiert und anschließend überschüssiges Material durch Waschen entfernt. Durch Bindung eines Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugats und anschließender Inkubation mit einem Färbesubstrat wurde durch eine enzymatische Reaktion ein unlöslicher Farbstoff erzeugt. So gefärbte positive Zellen konnten unterm Mikroskop detektiert werden. Dem Färbesubstrat wurde zusätzlich Levamisol beigefügt, um eventuell vorhandene endogene Phosphatasen zu inhibieren. Die Färbereaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und bei ausreichender Färbung mit TBS abgestoppt. Die Präparate wurden anschließend mit 100% Ethanol gespült und konnten nun zur Lasermikrodissektion eingesetzt werden.

Um die enthaltene RNA während des Färbeprozesses vor RNAsen zu schützen, wurden alle Absättigungs- bzw. AK-Lösungen mit 3% Prime RNase Inhibitor (Eppendorf) versetzt.

3.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Färbeprotokoll zur Untersuchung der Quantität und Verteilung der Zellen im Gewebe

Eine andere Methode Zellen spezifisch anzufärben ist die Immunfluoreszenzfärbung. Zu Beginn der Arbeit war es nicht möglich, fluoreszenzgefärbte Zellen durch

Lasermikrodissektion aus Gewebe zu isolieren. Deshalb wurde diese Methode zunächst dazu verwendet, sich einen Überblick über die Menge und Verteilung der T-Zellen im Gewebe zu verschaffen. Außerdem konnten durch die Fluoreszenzfärbung zwei Oberflächenmoleküle derselben T-Zelle gleichzeitig angefärbt werden, was mit der AP-Färbung nicht möglich war.

Die Gewebeschnitte wurden wie in II.3.1 beschrieben auf Objektträger ohne Folie aufgebracht und nach 20 minütiger Fixierung mit 4% Paraformaldehyd gründlich in PBS gewaschen. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen für 20min mit 2% Ziegen Serum/2% BSA in PBS wurden die Schnitte 40min mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper für 30min auf das Gewebe aufgebracht. Bei einer Doppelfärbung wurde der direkt markierte AK erst im zweiten Färbeschritt gemeinsam mit dem sekundären AK eingesetzt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Schnitt mit einem speziellen Eindeckmedium von DAKO eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet.

Färbeprotokoll zur Isolation von T-Zellen aus Gewebe

Nachdem ein neues Lasermikrodissektionsgerätes gekauft wurde, war es möglich, auch fluoreszenzgefärbte Zellen aus Geweben zu isolieren. Hierzu musste das Färbeprotokoll geringfügig geändert werden.

Die Schnitte wurden auf Folienobjektträger aufgebracht und ohne Fixierung direkt in die Färbung eingesetzt. Nach Absättigung mit 2% Ziegen Serum/2% BSA in PBS wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Waschen des Gewebes mit PBS wurde ein sekundärer AK und bei Bedarf ein direkt markierter AK auf den Schnitt aufgebracht. Nach erneutem Waschen wurden die Muskelgewebeschnitte mit Ethanol abgespült, getrocknet und zum Schneiden verwendet. Das Hirngewebe hingegen wurde mit PBS beschichtet und im feuchten Zustand nach positiven Zellen durchsucht. Nach Trocknen des Gewebes erfolgte auch hier die Isolation der Zellen. Der Grund für die Suche nach Zellen im feuchten Präparat ist die enorme Eigenfluoreszenz des trockenen Hirngewebes. Zur Bewahrung der RNA wurden, wie auch in der AP-Färbung, alle Inkubationslösungen mit 3% Prime RNase Inhibitor (Eppendorf) versetzt.

Kurzfärbeprotokoll

Um die RNA noch effektiver zu erhalten, wurde durch die Kollegin Jana Ivanidze ein Kurzprotokoll etabliert, welches im Rahmen dieser Arbeit zur Färbung der Hirnbiopsie angewandt wurde. Hierzu wurden die Gewebsschnitte nach kurzer Beschichtung mit PBS 3min mit 2% BSA in PBS inkubiert. Nach der Absättigung wurden die Schnitte 5min mit dem AK, verdünnt in 2% BSA in PBS, inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gespült. Im Falle eines sekundären AK erfolgte eine erneute 3minütige Inkubation. Nach dem Abspülen wurde das Gewebe mit 1-Propanol überschichtet und unter dem Mikroskop nach positiven Zellen

abgesucht. Nach dem Verdampfen des 1-Propanols konnten die markierten Zellen isoliert werden. Zum Schutz der RNA wurde 2,5% Protector RNase Inhibitor (Roche) zu allen Inkubationslösungen hinzugegeben.

3.4 Lasermikrodissektion

Die gefärbten Gewebeschnitte konnten direkt zur Lasermikrodissektion eingesetzt werden.

Die beiden hierfür verwendeten Mikroskope waren mit einem Laser gekoppelt und der Objektisch durch den Rechner steuerbar. Dies ermöglichte ein exaktes Bewegen des Objektträgers. Die Bilddaten wurden mittels einer Farb-CCD-Kamera an den Bildschirm übertragen.

Nach Justieren des Mikroskops und des PCR-Reaktionsgefäßes, wurde ein Objektträger in den Objektisch eingelegt und das Gewebe systematisch nach gefärbten Zellen abgesucht. Die detektierten Zellen wurden fotografiert und der Schneideweg des Lasers vorgegeben. Der Schneidvorgang selbst lief automatisch ab und konnte am Bildschirm verfolgt werden. Mit einem einzelnen gezielten Laserschuss wurde die Zelle aus dem Gewebe katapultiert. Die Zelle wurde im Deckel eines 200µl PCR-Reaktionsgefäßes aufgefangen, das zuvor in einer speziellen Halterung über dem Objektträger montiert wurde. Die Deckelinnenseite wurde mit Mineralöl bestrichen, um ein Anhaften der Zelle zu gewährleisten. Die katapultierten Zellen wurden auf Trockeneis gesammelt und anschließend bis zur PCR-Analyse bei -80°C gelagert. Das entstandene Loch im Gewebeverband wurde ebenfalls durch ein Foto dokumentiert.

4. Zellbiologische Methoden

4.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Zellen des Maus-T-Zell-Hybridoms $58\alpha\beta^-$ sowie die durch EBV immortalisierten B-Zellen des Patienten 16488 wurden in Suspensionskulturen gehalten. Als Grundmedium diente für beide Zelllinien das RPMI1640, das mit FKS, Penicillin/Streptomycin, non essential aminoacids sowie Natrium Pyruvat in den oben aufgeführten Konzentrationen versetzt wurde (II.1.10).

Die mit beiden TZR-Ketten sowie mit dem CD8-Corezeptor transfizierten $58\alpha\beta^-$ Zellen wurden zusätzlich durch Zugabe entsprechender Mengen von Antibiotika auf dem nötigen Selektionsdruck gehalten.

Bei einer entsprechenden Zelldichte wurde ein Teil der Zellen verworfen, die restlichen Zellen mit frischem Medium verdünnt.

Genicitin 418	100 mg/ml	Endkonz. 1,5mg/ml
Hygromycin B	50 mg/ml	Endkonz. 0,3mg/ml
Puromycin	1 mg/ml	Endkonz. 1,0µg/ml

4.2 Kultivierung von adhären wachsenden Zellen

Die adhären wachsenden Maus-Fibroblasten-Zellen LTK⁻, die menschliche Rhabdomyosarkom Zelllinie TE671 sowie die Verpackungszelllinie GP+E 86 wurden als Monolayer-Kultur in Zell-Kulturschalen oder -flaschen gehalten. Als Grundmedium diente das in Punkt II.1.10 aufgeführte RPMI1640 mit den entsprechenden Zusätzen.

Nach der Transfektion der LTK⁻- bzw. der TE671-Zellen mit verschiedenen HLA-Molekülen wurden die Zellen durch Antibiotika auf Selektionsdruck gehalten.

Bei einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch Trypsin-EDTA abgelöst und dieses mit Medium inaktiviert. Nach Zentrifugation und Aufnahme der Zellen in frischem Medium wurde ein Teil der Zellen in eine neue Kulturschale oder -flasche ausgebracht.

Genicitin 418	100 mg/ml	Endkonz. 0,3mg/ml L-Zellen Endkonz. 0,75mg/ml TE671
Puromycin	1 mg/ml	Endkonz. 3µg/ml GP+E 86

4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl vor Transfektionen oder Peptid-Library-Experimenten konnte die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Je nach Zelldichte wurden die Zellen 1:1 oder 1:10 in einer Trypanblau-Lösung (1:3 in PBS) verdünnt und in die Zählkammer eingebracht. Tote Zellen erschienen im Mikroskop dunkel gefärbt, da sie den Farbstoff aufgrund von Zellmembrandefekten aufnahmen und wurden beim Zählen nicht berücksichtigt. Nach Auszählen der vier Quadranten berechnete sich die Konzentration der Zellen in der ursprünglichen Suspension nach folgender Formel:

$$c = \text{Durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Quadrant} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 / \text{ml.}$$

4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden 10min bei 1200rpm zentrifugiert, in 1,5ml Einfriermedium (10% DMSO in FKS) aufgenommen und in Einfriereröhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen in einer mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox bei -80°C langsam eingefroren und nach 2-3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im 37°C Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und in ein mit Medium gefülltes Falconröhrchen überführt, um das DMSO zu verdünnen. Nach 10minütiger Zentrifugation wurden die Zellen in Medium aufgenommen und wie oben beschrieben kultiviert.

4.5 Transfektion von Zellen

4.5.1 Transfektion von Zellen durch Elektroporation

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen.

Die meisten Transfektionen wurden mittels Elektroporation mit Hilfe des Gene-Pulsers von BioRad durchgeführt. Hierbei wird die Zellmembran durch kurze elektrische Impulse für DNA permeabel gemacht und das gewünschte Plasmid kann so in die Zelle aufgenommen werden.

Transfektion der Maus-T-Zell- Hybridome 58 α β :

Pro Transfektionsansatz wurden 7×10^6 Zellen eingesetzt. Es musste darauf geachtet werden, dass die Zellen vor der Transfektion nicht länger als 7-10 Tage in Kultur waren, da sich sonst die Transfektionseffizienz verminderte. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI1640 ohne Zusätze gewaschen, anschließend in 800 μ l RPMI1640 ohne Zusätze aufgenommen und nach Überführen in eine Elektroporationsküvette (0,4cm; BioRad) 10min auf Eis inkubiert. Parallel dazu wurden 20-30 μ g präzipitierter Plasmid-DNA 30min bei 14.000rpm zentrifugiert, das DNA-Sediment unter der Sterilbank getrocknet und in 50 μ l RPMI1640 ohne Zusätze aufgenommen. Anschließend wurde die DNA zu den Zellen gegeben und weitere 10min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde bei 960 μ F und 280V durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen erneut 10min auf Eis inkubiert, anschließend in 10ml vorgewärmtes RPMI1640 mit Zusätzen überführt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen in 25ml-Zellkulturflaschen mit 20ml vorgewärmtem RPMI1640 mit Zusätzen überführt und zwei Tage inkubiert. Wenn sich das Medium gelb färbte, wurde ein Teil durch frisches Medium ersetzt.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen dann auf 24-well-Platten verteilt und mit den entsprechenden Selektionsantibiotikum versehen. Nach einer Inkubation von 10-14 Tagen konnten Klone gepickt und durch FACS-Analyse bzw. IL-2-ELISA analysiert werden.

Transfektion der LTK-Zellen bzw. der TE671-Zellen:

Die Transfektion der adhärent wachsenden LTK- bzw. TE671-Zellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Maus-T-Zell-Hybridome.

Nach der Transfektion wurden die Zellen jedoch gleich in 10cm-Zellkulturschalen ausgebracht und nach zwei Tagen mit Selektionsantibiotika versehen. Das Picken von Klonen erfolgte ebenfalls nach etwa 10-14 Tagen.

4.5.2 Transfektion von Zellen mit Lipofectamin

Die Lipofectamin-Transfektion wurde hauptsächlich für eine transiente Transfektion von Zellen verwendet.

Hierzu wurden die Zellen am Vortag so ausgebracht, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 70-80% aufwiesen. Je nachdem in welchem Volumen die Transfektion durchgeführt wurde, wurde eine entsprechende Menge präzipitierter DNA sowie Lipofectamin 2000 jeweils mit RPMI1640 ohne Zusätze gemischt und beides 5min bei Raumtemperatur inkubiert.

	Fläche pro well (cm ²)	Endvolumen	DNA in Volumen Medium	Lipofectamin 2000 in Volumen Medium
96-well	0,3	100µl	0,2µg in 25µl	0,5µl in 25µl
24-well	2	500µl	0,8µg in 50µl	2,0µl in 50µl
12-well	4	1ml	1,6µg in 100µl	4,0µl in 100µl
35-mm	10	2ml	4,0µg in 250µl	10µl in 250µl
6-well	10	2ml	4,0µg in 250µl	10µl in 250µl
60-mm	20	5ml	8,0µg in 0,5ml	20µl in 0,5ml
10-cm	60	15ml	24µg in 1,5ml	60µl in 1,5ml

Die DNA wurde dann tropfenweise in das Lipofectamingemisch gegeben und 20min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen durch RPMI1640 ohne Zusätze ersetzt und nach der Inkubationszeit das Lipofectamin/DNA-Gemisch vorsichtig auf die Zielzellen gegeben. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium durch RPMI1640 mit Zusätzen ersetzt, zwei Tage inkubiert und dann den Erfolg durch FACS-Analyse überprüft.

4.5.3 Selektion der transfizierten Zellen

Um eine ausreichende Antibiotikakonzentration zur Selektion transfizierter Zellen zu finden, wurde eine geeignete Anzahl von Zellen in eine 24-well-Platte ausgebracht und mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen etwa ein Woche kultiviert. Der Anteil toter Zellen wurde täglich protokolliert. Das Doppelte der Konzentration, bei der nach 5-6 Tagen alle Zellen tot waren, wurde als Selektionskonzentration eingesetzt.

4.6 Transduktion von Zellen mit Hilfe von Retroviren

Unter einer Transduktion versteht man die Übertragung von Genen mit Hilfe von Viren. Hier wurde das Gen für den menschlichen CD8-Corezeptor mittels Retroviren in die Maus-Hybridomzellen eingebracht.

Als Zelllinie für die Retrovirus-Produktion wurde die Verpackungszelllinie GP+E 86 (Klon 1A1) verwendet, welche zuvor mit einem retroviralen Vektor, der das Gen für den menschlichen CD8-Corezeptor trug, transfiziert wurde. Die Virionen, die nun von der Verpackungszelllinie produziert wurden, konnten die Zielzellen infizieren und das übertragene Gen wurde exprimiert.

Am Vortag wurden die GP+Es 86 in eine 6-well-Platte ausgebracht, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 40% aufwiesen. Anschließend wurden 5×10^4 Zellen der zu transduzierenden Maus-Hybridomzellen pro ml Medium zugegeben und für 48 Stunden co-kultiviert. Während dieser Zeit wurde kein Selektionsantibiotikum ins Medium gegeben. Nach zwei Tagen wurden die Hybridomzellen vorsichtig abgenommen und nun unter Selektionsdruck weiter kultiviert. Der Erfolg der Transduktion konnte nach 4-5 Tagen mittels FACS-Analyse überprüft werden.

4.7 FACS-Analyse

Zum Nachweis von Oberflächenproteinen wurden die Zellen durchflußzytometrisch mit einem FACS-Gerät (FACSSort, FACSCalibur von Becton Dickinson) analysiert.

Für jede Färbung wurden mind. 50.000-200.000 Zellen benötigt. Die Zellen wurden in die entsprechenden Näpfe einer 96-well-Spitzbodenplatte überführt und zweimal mit 200µl FACS-Puffer (1% FCS in PBS) gewaschen. Es wurden sowohl Färbungen mit direkt markierten AK, als auch Färbungen bei denen der sekundäre AK markiert war, durchgeführt. Die Zellen wurden in 50µl verdünnter AK-Lösung 30min auf Eis im Dunkeln inkubiert (Verdünnung 1:50 in FACS-Puffer) und anschließend erneut zweimal mit 200µl FACS-Puffer gewaschen. Wurde ein sekundärer AK zur Färbung eingesetzt, wurde das Verfahren mit einer Verdünnung von 1:200 wiederholt. Nach der letzten AK-Färbung wurden die Zellen zur Messung in FACS-Röhrchen überführt. Um die Detektion toter Zellen zu ermöglichen, wurde Propidiumjodid in einer Konzentration von 2µg/ml zu den gefärbten Zellen gegeben. Tote Zellen nehmen aufgrund ihrer defekten Zellmembran Propidiumjodid auf und zeigen daher bei einer Wellenlänge von 600-650nm ein starkes Signal. So konnte diese tote Zellpopulation bei der Analyse der Zellen ausgeschlossen werden.

Mit dem FACS-Gerät wurden die Parameter Licht-Streuung, Extinktion und Fluoreszenz der einzelnen Zellen bei den jeweils erforderlichen Wellenlängen gemessen. Der

Fluoreszenzhintergrund wurde mit einer Negativ-Kontrolle so eingestellt, dass die Emission im unteren Rand des Messbereichs lag. Pro Probe wurden 10.000 Zellen analysiert und anschließend mit einem Statistikprogramm des FACS-Gerätes ausgewertet.

4.8 Aktivierung der Transfektanten

4.8.1 Physiologische Aktivierung der Transfektanten

Die Kreuzvernetzung der TZR-Moleküle durch spezifische monoklonale AK führt zu einer physiologischen Aktivierung der Maus-Hybridomzellen worauf diese Interleukin-2 (IL-2) sezernieren. Diese IL-2-Produktion wurde gemessen, um die Funktionalität der transfizierten Hybridomzellen zu untersuchen.

In die Näpfe einer 96-well-Flachbodenplatte wurden 100µl des AK (verdünnt in PBS) mit einer Konzentration von 1µg/ml pipettiert und für mindestens zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Die AK-Lösung wurde abgesaugt und durch RPMI1640 ersetzt. Anschließend wurden 4×10^4 Zellen der zu testenden Transfektanten zugegeben und im Brutschrank inkubiert. Die IL-2-Konzentrationen in den Überständen wurden nach 16h durch EILISA gemessen.

4.8.2 Spezifische Aktivierung der Transfektanten über MHC/Peptid-Komplexe

Die Aktivierung von T-Lymphozyten im Körper geschieht über die Bindung des spezifischen Peptids, welches durch das MHC-Molekül auf der Zelloberfläche einer APZ präsentiert wird und bewirkt eine Sekretion von IL-2. Der gleiche Vorgang kann bei den Maus-Hybridomzellen JM22 beobachtet werden, wenn man diese mit dem auf HLA-A*02 präsentierten flu-Peptid 58-66 aktiviert.

Hierzu wurden am Vortag 3×10^4 Maus-LTK-Zellen, die mit dem entsprechenden humanen HLA-Molekül HLA-A*02 transfiziert waren, in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) wurden am folgenden Tag für 4-6 Stunden mit dem flu-Peptid (5µM) inkubiert, anschließend 4×10^5 Zellen des zu testenden Maus-Hybridom-Transfektanten JM22 zugegeben und für 13-16 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde die IL-2-Konzentration der Überstände im IL-2-ELISA gemessen.

4.9 Positional Scanning-Combinatorial Peptide Libraries (PS-CPL)

Um herauszufinden, welches Peptid bzw. Peptidmotiv der aus dem Patienten isolierte T-Zell-Rezeptor erkennt, wurden Library-Experimente mit verschiedenen Positional Scanning-Combinatorial Peptide Libraries (PS-CPL) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Degeneriertheit der TZR. Ein TZR erkennt nicht nur ein bestimmtes Peptid, das auf dem entsprechenden MHC-Molekül präsentiert ist, sondern mehrere verschiedene Peptide. Durch diese Methode ist es möglich, zunächst ein Peptidmotiv zu identifizieren, das durch den TZR erkannt wird (z.B. aromatische AS an Position 3, negativ geladene AS an Position 7). Anhand des Peptidmotivs können dann Kandidatenpeptide synthetisiert und einzeln auf ihre Aktivierungsfähigkeit getestet werden. Die hier verwendete Neunerpeptid-Library bestand aus 180 synthetisch hergestellten Peptidmischen (degenerierte Peptide), wobei jedes Peptid aus neun AS-Positionen bestand. Jeweils eine der neun möglichen Positionen war bekannt, alle anderen Positionen ein Gemisch aus allen 20 möglichen AS. Die degenerierten Peptide wurden synthetisiert und bereitgestellt von Clementia Pinilla, San Diego, CA. Nachfolgende Abbildung zeigt ein einfaches Beispiel einer solchen PS-CPL. Die Anzahl der Positionen beträgt hier drei, die Variabilität ist eingeschränkt auf vier verschiedene AS. Erhält man ein Signal in einem der Peptidmische, lässt sich so auf die an dieser Position vorhandene AS schließen.

Beispiel: Peptid-Library bestehend aus Dreierpeptiden XXX
mit vier verschiedenen Aminosäuren A R T G

a) Normale kombinatorische Library:
→ $4^3 = 64$ unterschiedliche Peptide

b) Positional Scanning Library:

OXX	XOX	XXO
AXX	XAX	XXA
RXX	XRX	XXR
TXX	XTX	XXT
GXX	XGX	XXG

→ $3 \times 4 =$ **nur 12 degenerierte Peptide (Peptidmische)**

Abb. 9: Prinzip der Positional Scanning-Combinatorial Peptide Library (PS-CPL)

Als APZs wurden entweder die mit EBV immortalisierten B-Zellen des zu untersuchenden Patienten oder die Maus-Fibroblastenzelllinie verwendet. Der Vorteil der autologen EBV-B-Zellen ist, dass sie von sich aus bereits alle patientenspezifischen HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. In die LTK-Zellen mussten diese zuvor hineintransfiziert werden. Am Versuchstag wurden 2×10^5 EBV-B-Zellen in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgebracht. Die LTK-Zellen (3×10^4 /well) wurden bereits einen Tag zuvor ausgebracht, um eine vollständige Adhärenz zu gewährleisten. Anschließend wurde der Peptidmix in einer Konzentration von 100ng/ml zugeben und für 4-6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 4×10^4 Maus-Hybridomzellen, die mit dem entsprechenden TZR transfiziert waren, zugegeben und 13-16 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die IL-2-Konzentration der Überstände im IL-2-ELISA gemessen. Als Positiv-Kontrolle wurde parallel eine Aktivierung mit einem AK gegen das murine CD3-Molekül durchgeführt.

4.10 Interleukin 2-ELISA

Mit Hilfe des IL-2-ELISAs wurde die Menge an IL-2, die nach Aktivierung der Maus-Hybridome ausgeschüttet wurde, gemessen. Hierfür wurde das Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go Kit von eBioscience verwendet.

Am Vortag des Versuchs wurde eine entsprechende Anzahl an 96-Loch-Maxisorb-Mikrotiterplatten (Nunc) mit je 50µl Capture-AK (1:250 in 1x Coating-Puffer) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) die vorbereiteten Platten mit je 200µl 1x Assay-diluent abgesättigt und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte eine zweistündige Inkubation mit je 100µl IL-2-Überstand. Zur Kontrolle des Versuchs wurde ein in 1x Assay-diluent verdünnter IL-2-Standard mit auf die Platte pipettiert. Anschließend wurde der Zellüberstand durch mehrmaliges Waschen entfernt und je 50µl Detektion-AK (1:250 in 1x Assay-Diluent) aufgebracht. Nach einer einstündigen Inkubation wurden je 50µl des Avidin-HRP-AK in gleicher Verdünnung in die Platte gegeben und eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Platte siebenmal mit Waschpuffer gewaschen und die Färbereaktion mit je 100µl 1x TMB Substrat-Lösung gestartet. Wenn das Signal stark genug erschien bzw. nach maximal 15min wurde die Reaktion mit je 50µl Stopp-Lösung (2N H₂SO₄) abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend nach Abstoppen bei 450nm im ELISA-reader gemessen.

III. Ergebnisse

1. Detektion expandierter TZR- β -Ketten durch CDR3-Spekatyping

Durch die CDR3-Spekatyping-Analyse wurde zunächst getestet, ob das Patientenmaterial für die Isolation expandierter Einzelzellen geeignet ist. Durch diese Methode erhält man ein Bild von der Verteilung und der Häufigkeit der einzelnen TZR- β -Ketten aller in den Patientenbiopsien enthaltenen T-Lymphozyten. Eine auftretende monoklonale Expansion einer TZR- β -Kette ist ein wichtiges Kriterium für die mögliche Autoaggressivität der T-Lymphozyten, da sie auf eine Antigen-induzierte Immunantwort hindeutet.

Für die Analyse wurde aus dem Biopsiematerial die RNA gewonnen, diese in cDNA umgeschrieben und anschließend in die Spekatyping-Reaktion eingesetzt (II.2.10). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Genescan 3.1.2.

Die Auswahl der Biopsien trafen wir aufgrund folgender Kriterien. Erstens mussten die monoklonal erscheinenden Expansionen durch Sequenzierung überprüft werden, um sicher zu gehen, dass es sich wirklich um eine monoklonale Expansion handelt. Es kann durchaus vorkommen, dass die NDN-Regionen bei gleicher V- und J-Region zufällig gleich lang sind und der Peak des Spekatypes deshalb optisch monoklonal erscheint. In der Sequenzierung tritt jedoch eine polyklonale Sequenz auf. Zweitens spielte die Verfügbarkeit des Antikörpers (AK) zum Färben der Biopsie eine entscheidende Rolle. Nicht für alle V β -Regionen sind AK erhältlich, auch die Sensitivität oder Spezifität ist oft nicht ausreichend. Drittens musste man die Anzahl konkurrierender TZR-J β innerhalb derselben TZR-V β beachten. Da der AK spezifisch für die V-Region ist, färbt dieser alle V β^+ -Zellen an, egal mit welchem NDNJ die V-Region kombiniert ist. Die Wahrscheinlichkeit einen T-Lymphozyten mit einer falschen V β -J β -Kombination zu isolieren und zu amplifizieren ist geringer, wenn die Anzahl konkurrierender J β möglichst klein ist.

Anhand der beschriebenen Kriterien haben wir aus den vorhandenen Myositisbiopsien zwei Patienten ausgewählt, deren Muskelbiopsien geeignet erschienen: der Polymyositispatient PM16488 sowie der Einschlußkörperchenmyositispatient IBM15551. Desweiteren haben wir das Blut sowie die Biopsie des Multiple Sklerose-Patienten FE untersucht. Nachfolgend sind die Spekatyping-Ergebnisse sowie die ausgewählte V β -J β -Population der untersuchten Patienten dargestellt.

1.1 Expandierte TZR- β -Ketten des Patienten PM16488

Die Analyse der Muskelbiopsie des Polymyositispatienten PM16488 anhand oben aufgeführter Kriterien ergab acht TZR-V β -J β -Kombinationen, die gegenüber allen anderen Kombinationen deutlich expandiert waren. Abb. 10a+b zeigt als Beispiel die V β 1-J β 1.2-Expansion, die später für die weitere Analyse ausgewählt wurde, sowie alle anderen V β 1-J β -Kombinationen.

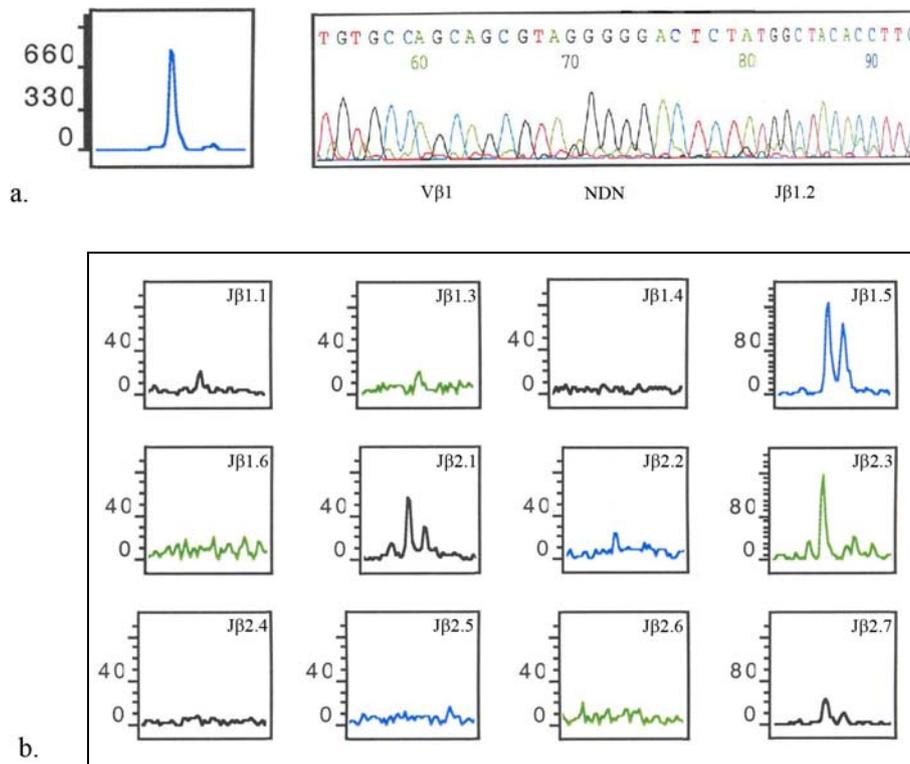


Abb. 10a: CDR3-Spektrotyping-Analyse der V β 1-J β 1.2-Kombination des Patienten PM16488 mit Nukleotidsequenz

Dargestellt ist die monoklonal expandierte TZR- β -Kette V β 1-NDN-J β 1.2, die für die nachfolgende Analyse ausgewählt wurde. Diese wurde durch das CDR3-Spektrotyping detektiert und zeigt eine relative Fluoreszenzintensität von etwa 700 Einheiten. Die Nukleotidsequenz zeigt einen Teil der V β 1-NDN-J β 1.2-Region.

Abb. 10b: CDR3-Spektrotyping-Analyse aller V β 1-J β -Kombinationen des Patienten PM16488

Dargestellt sind die Ergebnisse der CDR3-Spektrotyping-Analyse aller V β 1-J β -Kombinationen. Diese weisen keine signifikante Fluoreszenzintensität im Gegensatz zur ausgewählten Kombination auf.

Tabelle 1 zeigt die Auswahl aller expandierten V β -J β -Kombinationen des Patienten, sowie einige Kriterien, die das Befürworten oder das Ablehnen der einzelnen Expansionen begründeten.

V-Region	J-Region	Relative Fluoreszenzintensität	Anmerkung
1	1.2	700	Hohe Expansion, AK bindet sehr gut → ausgewählte Expansion
4	1.2	150	Kein AK erhältlich
7	2.7	600	AK färbt unspezifisch
8	2.7	350	AK färbt nur mäßig
9	1.2	350	AK färbt nur mäßig
9	2.6	200	AK färbt nur mäßig
14	1.3	800	Hohe Expansion, AK bindet sehr gut, → Alternative zu Vβ1-Expansion
15	2.5	300	Kein AK erhältlich

Tabelle 1: Expandierte TZR-Vβ-Ketten des Patienten PM16488

Auflistung aller expandierten Vβ-Jβ-Kombinationen des Patienten PM16488. Die relative Fluoreszenzintensität liegt zwischen 150-800 Einheiten. Die rechte Spalte stellt Gründe dar, die für oder gegen die weitere Analyse der einzelnen Kombinationen sprechen. Die expandierte β-Kette Vβ1-NDN-Jβ1.2 wurde als beste Kombination ausgewählt.

Wie bereits erwähnt, haben wir die Vβ1-Jβ1.2-TZR-Kette zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Sequenzierung des Spektratyp-Peaks ergab eine eindeutig lesbare Sequenz (Abb. 10a) und bestätigt die monoklonale Expansion. Der AK gegen die variable Region der Vβ1-Kette ist erhältlich und färbt sehr spezifisch. Desweiteren ist die Konkurrenz der Vβ1-Jβ1.2-Paarung sehr gering (siehe Abb. 10b). Die Expansionen der anderen Vβ1-Jβ-Paarungen zeigen nur eine geringe relative Fluoreszenzintensität (zwischen 10 und 160) gegenüber der ausgewählten Paarung (ca. 700).

1.2 Expandierte TZR-β-Ketten des Patienten IBM15551

Dieselbe Analyse wurde mit den CDR3-Spektratyping-Daten des Einschlußkörperchenmyositispatienten IBM15551 durchgeführt. Hier traten weitaus mehr Vβ-Jβ-Kombinationen als monoklonale Expansionen auf. In der nachfolgenden Tabelle sind die höchsten Expansionen aufgeführt.

V-Region	J-Region	relative Fluoreszenzintensität	Anmerkung
1	1.3	800	Zu schwache Expansion
1	2.2	400	Zu schwache Expansion
2	1.3	1000	Zu schwache Expansion
3	1.2	600	Zu schwache Expansion
5.2	2.7	1400	Hohe Expansion, AK bindet sehr gut, → Alternative zu Vβ23-Expansion
7	1.2	1600	AK färbt unspezifisch
11	2.2	1200	AK färbt nur mäßig

V-Region	J-Region	relative Fluoreszenzintensität	Anmerkung
13.2	1.5	900	Kein AK erhältlich
14	1.4	800	Zu hohe Konkurrenzexpansionen
14	2.2	800	Zu hohe Konkurrenzexpansionen
14	2.6	1200	Zu hohe Konkurrenzexpansionen
16	1.2	1800	Hohe Expansion, AK bindet sehr gut, → Alternative zu V β 23-Expansion
22	1.3	800	Zu hohe Konkurrenzexpansionen
22	2.3	1000	Zu hohe Konkurrenzexpansionen
23	1.1	1600	Hohe Expansion, AK bindet sehr gut → ausgewählte Expansion

Tabelle 2: Expandierte TZR-V β -Ketten des Patienten IBM15551

Auflistung aller expandierten V β -J β -Kombinationen des Patienten IBM15551. Die relative Fluoreszenzintensität liegt zwischen 150-1800 Einheiten. Die rechte Spalte stellt Gründe dar, die für oder gegen die weitere Analyse der einzelnen Kombinationen sprechen. Die expandierte β -Kette V β 23-NDN-J β 1.1 wurde als beste Kombination ausgewählt.

Nach der Analyse der Daten anhand der aufgeführten Kriterien wurde für den Patienten IBM15551 die Expansion der V β 23-J β 1.1-TZR-Kette ausgewählt. Diese ist nachfolgend zusammen mit der Nukleotidsequenz aufgeführt (Abb. 11). Mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 1600 zählt diese V β -J β -Kombination zu den Stärksten. Der AK färbt spezifisch und sensitiv und auch die Sequenzierung des Peaks zeigt eine eindeutig monoklonale Sequenz.

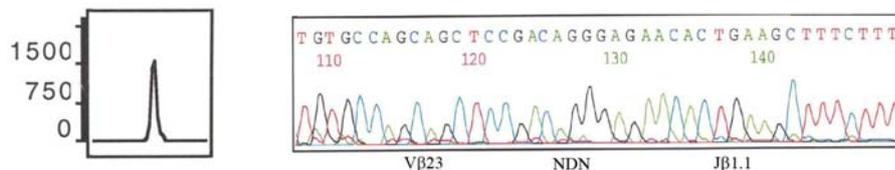


Abb. 11: CDR3-Spektratyping-Analyse der V β 23-J β 1.1-Kombination des Patienten IBM15551 mit Nukleotidsequenz

Dargestellt ist die monoklonal expandierte TZR- β -Kette V β 23-NDN-J β 1.1 des Patienten IBM15551 mit einer relativen Fluoreszenzintensität von etwa 1600 Einheiten. Diese wurde als beste Kombination für die weitere Analyse ausgewählt. Die Nukleotidsequenz zeigt einen Teil der V β 23-NDN-J β 1.1-Region.

1.3 Expandierte TZR- β -Ketten des MS-Patienten FE

Wie bereits einleitend erwähnt, haben wir Daten früherer CDR3-Spektratypen als Grundlage der Analyse des MS-Patienten FE herangezogen. Das Spektratyping, durchgeführt mit Hirngewebe 1996 sowie mit Blut 2001 durch Babbe et al. (2000). und Skulina et al. (2004), zeigte eine eindeutige monoklonale Expansion der V β 1-J β 2.3-TZR-Kette. Diese Expansion sowie die dazugehörige Sequenz sind in Abb. 12a dargestellt.

Die gleiche Expansion konnten wir 2003 in einer erneuten Blutprobe des Patienten nochmals detektieren (Abb. 12b). Dies beweist, dass eine klonale Expansion durchaus mehrere Jahre im Körper des Patienten persistieren kann ohne sich zu verändern. Die CD8⁺/Vβ1⁺ T-Lymphozyten dieser Blutprobe wurden nun für die Suche nach TZR-Paaren verwendet.

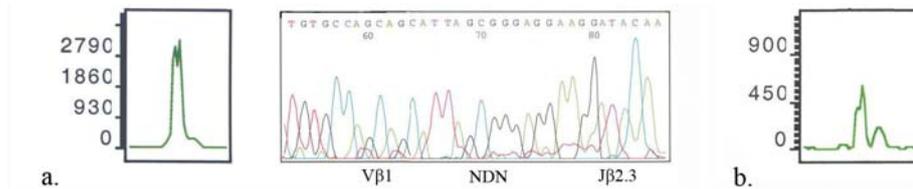


Abb. 12a: CDR3-Spektratyping-Analyse der Vβ1-Jβ2.3-Kombination des Patienten FE aus der Hirnbiopsie mit Nukleotidsequenz

Dargestellt ist die CDR3-Spektratyping-Analyse der monoklonal expandierten TZR-β-Kette Vβ1-NDN-Jβ2.3, welche aus der Hirnbiopsie des MS Patienten FE durch Babbe et al. durchgeführt wurde. Sie zeigt eine relative Fluoreszenzintensität von etwa 3000 Einheiten. Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt der Vβ-NDN-Jβ-Region der beschriebenen Kette.

Abb. 12b: CDR3-Spektratyping-Analyse der Vβ1-Jβ2.3-Kombination des Patienten FE aus Blutzellen

Dargestellt ist die 2003 durchgeführte CDR3-Spektratyping-Analyse aus dem Blut des Patienten FE, welche die durch Babbe et al. detektierte Vβ1-NDN-Jβ2.3-Expansion bestätigt.

Weitere Blutanalysen 2005 konnten die Vβ1-Expansion nicht mehr bestätigen, sondern zeigten eine polyklonale Gauß'sche-Verteilung. Der Grund hierfür könnte laut behandelndem Arzt an den Medikamenten liegen, die der Patient während seiner Therapie bekommt. Die zuvor schubförmig verlaufende MS-Erkrankung wandelte sich zu einer sekundär progressiven MS.

2. Isolierung expandierter Einzelzellen aus Blut, Muskel- und Hirngewebe

Durch das CDR3-Spektratyping wurden, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, die TZR-Vβ-Jβ-Kombinationen ausgewählt, die für die Isolation und Analyse am geeignetsten erschienen. Der folgende Abschnitt zeigt die verschiedenen Färbungen der Biopsien sowie die anschließende Isolation der Einzelzellen. Zunächst wird die Isolation von Einzelzellen aus dem Muskelgewebe der beiden Myositispatienten PM16488 und IBM15551, anschließend die Isolation aus Blut und Hirngewebe des MS-Patienten FE näher erläutert.

2.1 Färbung und Isolierung expandierter Einzelzellen aus Muskelgewebe der Myositispatienten PM16488 sowie IBM15551

Von beiden ausgewählten Myositisbiopsien haben wir, wie unter II.3.1 beschrieben, 10µm dicke Gefrierschnitte auf Objektträger aufgebracht. Die Vβ-Region des TZR wurde mit dem entsprechenden AK gefärbt und die positiven Zellen durch Lasermikrodissektion aus dem Gewebe isoliert. Die zur Isolation geeigneten T-Zellen mussten eine der nachfolgenden morphologischen Kriterien erfüllen. Entweder mussten sie in engem physikalischen Kontakt mit der Muskelfibrille stehen, eine kappenartige Struktur auf der Muskelfibrille ausbilden oder die Muskelzelle invadieren. Nur bei solchen Zellen konnte man davon ausgehen, dass sie aktiv an der Erkrankung beteiligt sind, diese vielleicht sogar auslösen. Alle anderen Zellen, sog. „bystander-Zellen“, wurden nicht berücksichtigt, da sie möglicherweise nur durch entzündungsbedingte Cytokinausschüttung angelockt wurden und nicht aktiv an der Pathogenese beteiligt sind. Außerdem durfte die Zielzelle nicht im Verband mit anderen Zellen vorliegen, um so die Isolation einer einzelnen Zelle zu gewährleisten.

2.1.1 Immunhistochemische Vorversuche auf Tonsillen- und Muskelgewebe

Bevor die Färbung auf Biopsiegewebe durchgeführt werden konnte, mussten wir zunächst die optimale Konzentration der verwendeten AK ermitteln. Hierfür wurde Tonsillengewebe verwendet, da dies reich an Lymphozyten ist. Später wurde das Ergebnis auf Muskelgewebe bestätigt. Wir führten sowohl Fluoreszenzfärbungen als auch Färbungen mit alkalischer Phosphatase (AP) durch. Anfangs, d.h. bei der Analyse der Patienten PM16488 sowie IBM15551, wurde die Fluoreszenzfärbung lediglich dafür benutzt, einen Überblick über die Menge und Verteilung der T-Lymphozyten in der Muskelbiopsie zu erhalten. Die anschließende Isolation von Zellen erfolgte aus AP-gefärbten Schnitten, da zu diesem Zeitpunkt die Mikrodissektion von Zellen fluoreszenzgefärbter Präparate noch nicht möglich war. Während der Analyse des MS-Patienten FE konnten auch fluoreszenzgefärbte Zellen durch ein neues Lasermikrodissektionsgerät isoliert werden. Somit trat die AP-Färbung in den Hintergrund.

Zur AK-Testfärbung brachten wir Tonsillenschnitte mit einer Dicke von 10µm auf Glasobjektträger auf und färbten diese mit einem AK gegen die Vβ1-Region des TZR sowie einem AK gegen das menschliche CD8-Molekül. Der CD8-AK war direkt mit dem FITC-Farbstoff gekoppelt, der unmarkierte Vβ1-AK musste mit einem Cy3-gekoppelten sekundären AK sichtbar gemacht werden. Die Präparate wurden nach der Färbung mit einem Deckglas

versehen, um die optimale Qualität bei der mikroskopischen Analyse zu erhalten. Die späteren Färbungen zur Isolation von Zellen führten wir auf Objektträgern durch, die mit einer speziellen Folie beschichtet und nicht mit einem Deckglas überlagert waren. Dies setzte die Qualität der Färbung zwar stark herab, war jedoch für die Isolation notwendig.

Abb. 13 zeigt die Testfärbung auf Tonsillengewebe mit dem AK gegen die V β 1-Region des TZR bzw. gegen das menschliche CD8-Molekül.

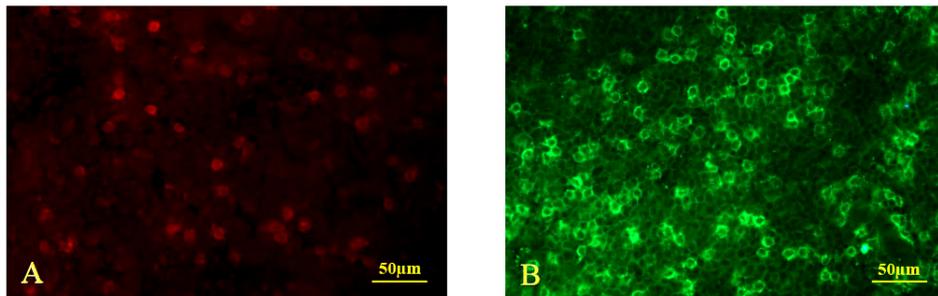


Abb. 13: Fluoreszenzaufnahmen von V β 1⁺- bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten aus Tonsillengewebe

A: Fluoreszenzfärbung V β 1⁺-T-Lymphozyten aus Tonsillengewebe. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti V β 1-AK betrug 1:200 in 2%Ziegen Serum/2%BSA in PBS, die des Ziege-anti-Ratte-Cy3-AK betrug 1:100 in 2%Ziegen Serum/2% BSA in PBS.

B: Fluoreszenzfärbung CD8⁺-T-Lymphozyten aus Tonsillengewebe. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti CD8-FITC-AK betrug 1:20 in 2%Ziegen Serum/2%BSA in PBS.

Wir verwendeten den AK gegen die V β 1-TZR-Kette in einer Verdünnung von 1:200, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markierte sekundäre AK in einer Verdünnung von 1:100. Der mit dem FITC-Farbstoff direkt markierte CD8-AK wurde 1:20 eingesetzt.

Um einen Überblick über die Menge und Verteilung der T-Lymphozyten in der Muskelbiopsie zu erhalten und um die getesteten AK auf dem Muskelgewebe zu überprüfen, wurde anschließend Muskelgewebe mit den gleichen AK immunhistochemisch gefärbt.

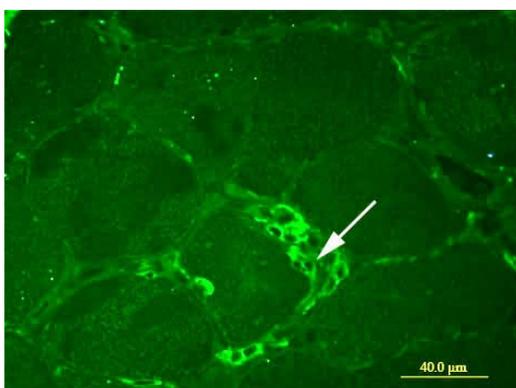


Abb. 14: Fluoreszenzaufnahme von CD8⁺-T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488

Fluoreszenzfärbung CD8⁺-T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488.

Die eingesetzte AK-Konzentration des anti CD8-FITC-AK betrug 1:20 in 2%Ziegen Serum/2%BSA in PBS.

Der Pfeil markiert eine fokale T-Zell-Invasion in die Muskelfibrille, ein wichtiges Kriterium zur Diagnose von PM.

Die CD8-Übersichtsfärbung (Abb. 14) zeigt eine fokale T-Zell-Invasion in die Muskelfibrille, die mit einem Pfeil markiert ist. Solche Invasionen stellen ein wichtiges Kriterium zur Diagnose der Polymyositis dar (Arahata und Engel, 1984). Diese dichten T-Zell-Ansammlungen eignen sich jedoch nicht zur Isolation und Analyse, da es nicht möglich ist, eine einzelne Zelle zu isolieren.

Abb. 15 zeigt zwei Beispiele einer für die Isolation geeigneten $V\beta 1^+$ / $CD8^+$ -Zelle. Beide Zellen liegen einzeln und nicht im Verband mit anderen T-Zellen vor und stehen im direkten Kontakt mit der Muskelfaser. Hierfür wurde die Biopsie mit dem AK gegen die $V\beta 1$ -Region des TZR sowie mit dem FITC-markierten AK gegen den Corezeptor CD8 gefärbt. Die Detektion des $V\beta 1$ -AK erfolgte durch den Cy3-markierten sekundären AK. Nach der Überlagerung der beiden Bilder erkennt man, dass der $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyt in rot gleichzeitig CD8 positiv ist (grün). Die doppelt positive Zelle erscheint gelb.

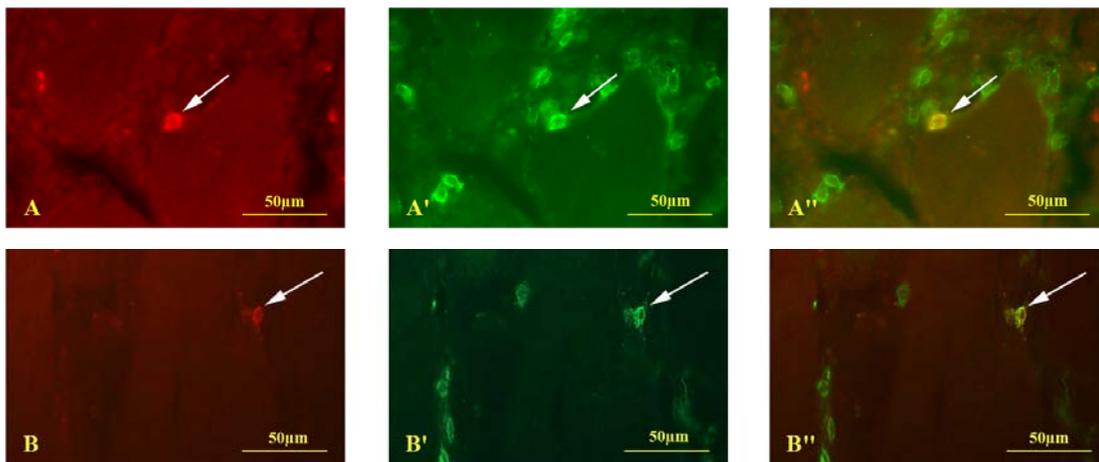


Abb. 15: Fluoreszenzaufnahmen von $V\beta 1^+$ - bzw $CD8^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488

A und B: Fluoreszenzfärbung $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti $V\beta 1$ -AK betrug 1:200 in 2%Ziegen Serum/2%BSA in PBS, die des Ziege-anti-Ratte-Cy3-AK betrug 1:100 in 2%Ziegen Serum/2% BSA in PBS.

A' und B': Fluoreszenzfärbung $CD8^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti $CD8$ -FITC-AK betrug 1:20 in 2%Ziegen Serum/2%BSA in PBS.

A'' und B'': overlay von A und A' bzw. B und B'

Die $V\beta 1^+$ / $CD8^+$ -Zellen sind mit einem Pfeil markiert.

Da wie bereits erwähnt die Isolation der Einzelzellen der Patienten PM16488 und IBM15551 mit AP-gefärbten Schnitten erfolgte, haben wir den $V\beta 1$ -AK sowie einen biotinylierten sekundären AK mit dieser Färbemethode auf Tonsillengewebe (Abb. 16A) und auf Muskelgewebe getestet (Abb. 16B).

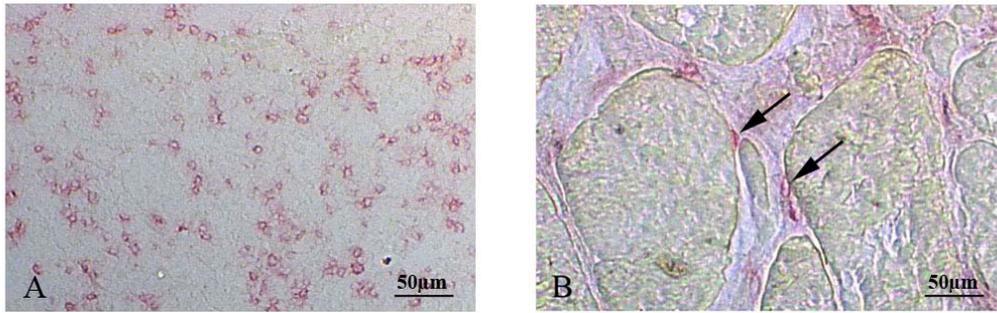


Abb. 16: AP-Färbung von $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten auf Tonsillengewebe sowie Muskelgewebe des Patienten PM16488

A: AP-Färbung $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten aus Tonsillengewebe. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti $V\beta 1$ -AK betrug 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS, die des Schaf-anti-Ratte-Biotin-AK 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS.

B: AP-Färbung $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti $V\beta 1$ -AK betrug 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS, die des Schaf-anti-Ratte-Biotin-AK 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS.

Die potentiell autoaggressiven T-Lymphozyten sind mit einem Pfeil markiert.

Sowohl der unmarkierte $V\beta 1$ -AK als auch der biotinylierte AK wurde in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Die Färbung des Muskelgewebes zeigt einige Zellen, die zur Isolation geeignet sind, da sie engen Kontakt zur Muskelfibrille aufweisen. Diese sind mit einem Pfeil markiert. Es sind auch viele bystander-Zellen zu sehen. Durch die Lasermikrodissektion ist jedoch möglich, nur die relevanten Zellen zu isolieren.

2.1.2 Isolierung expandierter $V\beta 1^+$ bzw. $V\beta 23^+$ Einzelzellen der Myositispatienten PM16488 bzw. IBM15551 durch Lasermikrodissektion

Nach dem AK-Test konnten wir mit der Isolation von $V\beta 1^+$ Zellen des Patienten PM16488 beginnen. Hierfür wurden Gewebeschnitte (Dicke $10\mu\text{m}$) auf Folienobjektträger aufgebracht und mit dem AK gegen die $V\beta 1$ -Region des TZR gefärbt. Wir verwendeten die Methode der AP-Färbung, da zu diesem Zeitpunkt wie bereits erwähnt die Isolation von Zellen fluoreszenzgefärbter Präparate noch nicht möglich war. Zur Isolation wurden die einzelnen Zellen mit einem Laserstrahl aus dem Gewebe herausgeschnitten und durch einen gezielten Laserschuss in das darüber platzierte PCR-Reaktionsgefäß katapultiert (siehe Material und Methoden II.3.4).

Insgesamt isolierten wir 1230 $V\beta 1^+$ Einzelzellen aus dem Biopsiematerial des Patienten PM16488. In Abb. 17 ist eine Auswahl isolierter T-Zellen dargestellt, die später in der Analyse durch die Einzelzell-RT-PCR sowohl für die TZR- β - als auch für die TZR- α -Kette ein

positives Signal zeigten. Das linke Bild zeigt jeweils die AP-Färbung mit dem AK gegen die $V\beta 1$ -Region vor der Isolation, das rechte Bild das Loch im Gewebeverband nach Katapultieren der Zelle in das PCR-Gefäß.

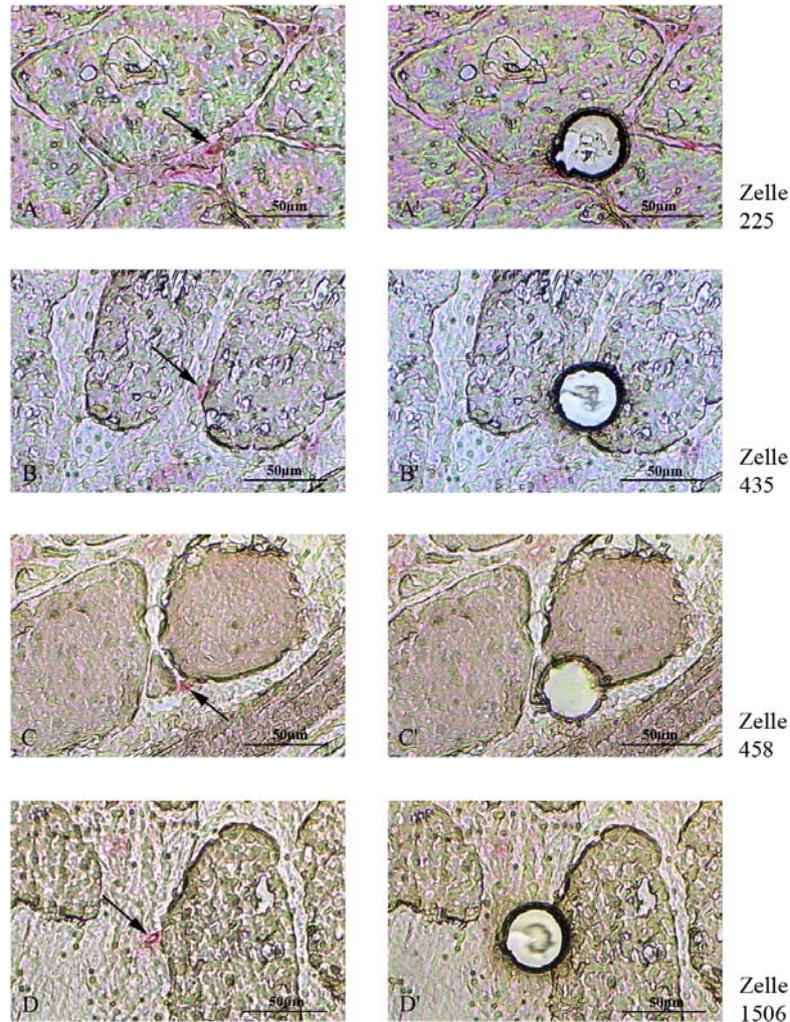


Abb. 17: AP-Färbung von $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488 mit anschließender Lasermikrodissektion

A-D: AP-Färbung $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten aus Muskelgewebe des Patienten PM16488. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti $V\beta 1$ -AK betrug 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS, die des Schaf-anti-Ratte-Biotin-AK 1:100 in 2%Ziegen Serum in TBS.

Die potentiell autoaggressiven T-Lymphozyten sind mit einem Pfeil markiert.

A'-D': Loch im Gewebeverband nach Katapultieren der Einzelzelle in das PCR-Gefäß.

Das Gewebe ist auf einen Folienobjektträger aufgebracht und liegt offen ohne Deckglas überschichtet vor.

Um die Zellen aus dem Gewebeverband durch Lasermikrodissektion isolieren zu können, liegen die Proben auf Folienobjektträgern, trocken und ohne Deckglas vor. Dies ist der Hauptgrund für den relativ schlechten morphologischen Zustand der Biopsie. Der trockene Zustand erhöht die Lichtbrechung an den Rändern des Gewebes und verschlechtert die Qualität der Schnitte. Das Trocknen zerstört zudem an einigen Stellen den Zellverband, wodurch der T-

Lymphozyt oftmals ein wenig entfernt von der Muskelfaser erscheint. Die zuvor gezeigten Testfärbungen wurden unter optimalen Bedingungen, auf Glasobjekträgern ohne Folie und mit einem Deckglas überlagert durchgeführt. Hierdurch erhält man eine wesentlich bessere Qualität. Der aus dem Gewebe ausgeschnittene Bereich erscheint im Verhältnis zur Größe der isolierten Zelle relativ groß. Dies liegt an der Dicke des Laserstrahls, der die Zelle aus dem Gewebeverband löst. Der Bereich, der nach dem Ausschneiden vom Gewebe übrig bleibt und in das PCR-Reaktionsgefäß katapultiert wird, ist nicht viel größer als die T-Zelle selbst. Ein gewisser Sicherheitsabstand muss natürlich eingehalten werden, damit die Zelle bei der Isolation nicht beschädigt wird und dadurch RNA verloren geht.

Die Analyse der isolierten Zellen durch die Einzelzell-RT-PCR ist in Kapitel III.3.2 beschrieben.

Aus dem Patient IBM15551 isolierten und analysierten wir insgesamt 250 $V\beta 23^+$ Einzelzellen. Die Patientenbiopsie war sehr klein, weshalb wir keine weiteren Zellen analysieren konnten. Die Färbung erfolgte ebenfalls mit Alkalischer Phosphatase.

2.2 Färbung und Isolierung expandierter $V\beta 1^+$ Einzelzellen aus Blut und Hirngewebe des MS-Patienten FE

Wie in Punkt III.1.3 bereits aufgeführt, konnten wir bei dem MS-Patienten FE die 2001 im Blut detektierte $V\beta 1$ - $J\beta 2.3$ Expansion in einer frischen Blutprobe von 2003 wieder finden. Wir analysierten daher zunächst die $CD8^+/V\beta 1^+$ T-Lymphozyten dieser Probe, um die Hirnbiopsie zurückzuhalten. Um die $CD8^+/V\beta 1^+$ T-Lymphozyten zu isolieren, wurden die Zellen zunächst auf CD8 sowie $V\beta 1$ sortiert. Anschließend wurden sie durch Picken mit der Pipette, FACS-Sort oder Cytospin mit anschließender Lasermikrodissektion in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Insgesamt isolierten wir auf diese Weise 2500 $CD8^+/V\beta 1^+$ T-Zellen.

Nach der Analyse der Blutzellen untersuchten wir die Hirnbiopsie des MS-Patienten FE. Die Färbung erfolgte auf Folienobjekträgern und die Isolation konnte mit dem neuen Lasermikrodissektionsgerät unter Fluoreszenzbedingungen durchgeführt werden. Die Fluoreszenzfärbung bringt im Gegensatz zur Färbung mit alkalischer Phosphatase enorme Vorteile. Dies ist in Abschnitt III.3.1.1 näher erläutert. Da sowohl bei dem MS-Patienten als auch bei dem Patienten PM16488 eine $V\beta 1$ -Expansion vorlag, konnten die gleichen AK eingesetzt werden. Aus der Hirnbiopsie wurden insgesamt 198 $V\beta 1^+$ T-Lymphozyten isoliert.

Nachfolgende Abb. 18 zeigt $CD8^+/V\beta 1^+$ T-Lymphozyten, die durch Lasermikrodissektion isoliert und anschließend analysiert wurden. Das linke Bild zeigt die CD8- das mittlere Bild die

Vβ1-Färbung der T-Zelle. Das rechte Bild zeigt das Loch nach Isolation der Zelle aus dem Gewebeverband.

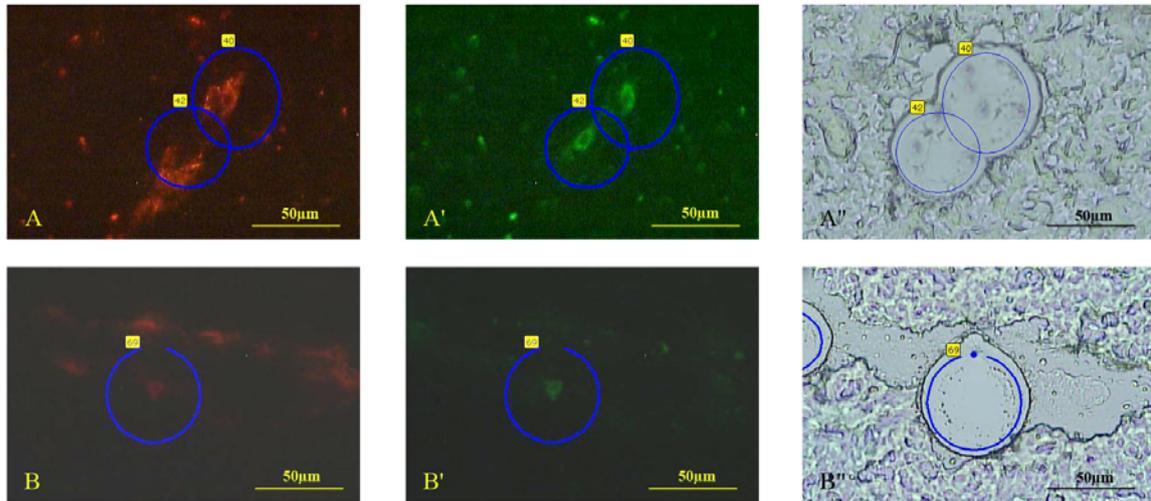


Abb. 18: Fluoreszenzfärbung von Vβ1⁺- bzw. CD8⁺-T-Lymphozyten aus Hirngewebe des Patienten FE mit anschließender Lasermikrodissektion

A und B: Fluoreszenzfärbung Vβ1⁺-T-Lymphozyten aus Hirngewebe des MS Patienten FE. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti Vβ1-AK betrug 1:200 in 2%Ziegen Serum/2% BSA in PBS, die des Ziege-anti-Ratte-Cy3-AK 1:100 in 2%Ziegen Serum/2% BSA in PBS.

A' und B': Fluoreszenzfärbung CD8⁺-T-Lymphozyten aus Hirngewebe des MS Patienten FE. Die eingesetzte AK-Konzentration des anti CD8-FITC-AK betrug 1:20 in 2%Ziegen Serum/2% BSA in PBS.

A'' und B'': Loch im Gewebeverband nach Katapultieren der Einzelzelle in das PCR-Gefäß. Das Gewebe ist auf einen Folienobjektträger aufgebracht und mit PBS überschichtet.

3. Analyse isolierter Einzelzellen durch die Einzelzell-RT-PCR

Nach der Isolation der T-Lymphozyten aus den Geweben sowie aus Blut wurden diese durch eine speziell entwickelte Einzelzell-RT-PCR-Methode analysiert (II.2.7.3). Im nachfolgenden Kapitel sind zunächst einige Vorversuche aufgeführt, welche die Effizienz der Methode aufzeigen sowie die anschließende Analyse der isolierten Einzelzellen der verschiedenen Patienten.

Der Vorteil der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Einzelzell-RT-PCR-Methode besteht darin, dass die TZR-α- und β-Kette derselben Einzelzelle amplifiziert werden können. Dies war bisher noch nicht möglich. Für die Amplifikation wurde die RNA zunächst mittels RT-Primer in der konstanten Region der α- und β-Kette in cDNA umgeschrieben (RT-PCR) und anschließend beide Ketten durch eine Prä-Amplifikation vermehrt (α+β-Prä-Amplifikation). Da wir für die Amplifikation der TZR-β-Kette klonenspezifische Primer einsetzen konnten, bekannt aus den CDR3-Spektratypen-Daten, untersuchten wir die Zellen zuerst auf die Expression der expandierten TZR-β-Kette (β-PCR). Positive Zellen wurden anschließend auf eine korrespondierende TZR-α-Kette hin analysiert (α-PCR). Durch die universellen Primer

Sets war die uneingeschränkte Amplifikation aller theoretisch vorkommenden TZR- α -Ketten möglich. Zuletzt untersuchten wir alle β^+ -Zellen nochmals mit klonspezifischen Primern gegen die bereits detektierten α -Ketten. So konnte man die bereits gefundenen Ketten bestätigen und möglicherweise weitere $\alpha\beta$ -Paarungen detektieren. Abb. 19 zeigt die Schritte der Einzelzell-PCR sowie die relative Lage der eingesetzten Primer bzw. Primer Sets.

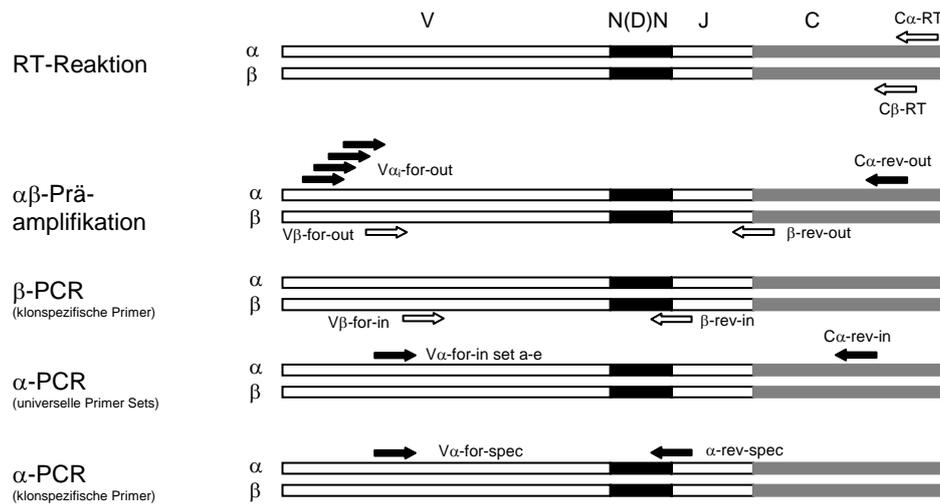


Abb. 19: Schema der Einzelzell-RT-PCR-Methode mit relativer Lage der verwendeten Primer

Die Graphik zeigt die verschiedenen Schritte der Einzelzell-RT-PCR. Beginnend mit der RT-Reaktion, $\alpha\beta$ -Präamplifikation bis zur β -PCR. Die β^+ -Zellen werden auf eine gepaarte α -Kette untersucht (α -PCR). Zur Bestätigung der gefundenen und zur Detektion weiterer $\alpha\beta$ -Pärchen erfolgt eine PCR mit klonspezifischen Primern gegen die bereits detektierten α -Ketten. Die Pfeile zeigen die relative Lage der verwendeten Primer.

Der gesamte Vorgang vom CDR3-Spektratyping über die Analyse der isolierten Zellen durch die Einzelzell-RT-PCR bis hin zur Antigensuche ist in der Einleitung unter I.7.2, Abb. 6 anhand eines Schemas dargestellt.

3.1 Bestimmung der Effizienz der Einzelzell-RT-PCR

In Vorversuchen testeten wir zunächst die Effizienz der PCR-Methode. Als Testzelllinie wurde die murine Hybridomzelllinie $58\alpha\beta^+$ verwendet. Diese Zelllinie exprimiert keinen eigenen TZR, kann aber mit menschlichen TZR transfiziert werden, die dann auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Wir konnten auf eine bereits vorhandene Transfektante der Hybridomzelllinie $58\alpha\beta^+$ zurückgreifen, die einen $V\beta 17$ - $V\alpha 2.3$ -TZR exprimiert. Diese Transfektante wird nachfolgend als COP-1 bezeichnet. Für die Versuche zur Simulation eines dualen TZR wurde eine zweite bereits vorhandene Transfektante verwendet, die als BBC9 bezeichnet wird und einen $V\beta 22$ - $V\alpha 9$ -TZR exprimiert. Die Zellen wurden mittels Cytospin

(II.3.2) auf Folienobjektträger aufgebracht, einzelne Zellen durch Lasermikrodissektion isoliert und analysiert.

3.1.1 Effizienz für die Amplifikation eines TZR ungefärbter sowie gefärbter Zellen

Im ersten Vorversuch testeten wir die Effizienz der PCR ungefärbter Zellen sowie fluoreszenz- bzw. AP-gefärbter Zellen. Die nicht gefärbten Zellen gaben Aufschluss über die generelle PCR-Effizienz, die gefärbten Zellen über die Auswirkung einer Färbung auf die Qualität und Stabilität der RNA. Alle isolierten Zellen wurden anschließend mit der Einzelzell-RT-PCR analysiert, wobei für die TZR- β -Kette klonspezifische Primer für V β 17 (V β -17-for-out - COP-1/17 β -rev-out sowie V β -17-for-in - COP-1/17 β -rev-in) und für die TZR- α -Kette universelle Primer Sets eingesetzt wurden (V α -X₁₋₂₄ -for-out - C α -rev-out sowie V α -Set a-e - C α -rev-in). Wir überprüften nur diejenigen Zellen auf eine α -Kette, die ein positives Ergebnis in der β -Ketten-PCR lieferten. Die genauen Sequenzen der verwendeten Primer sind im Material und Methodenteil aufgeführt (II.1.6.1).

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Effizienz der Einzelzell-RT-PCR ungefärbter, fluoreszenzgefärbter oder mit alkalischer Phosphatase gefärbter Zellen.

	Anzahl analysierter Zellen	V β 17-Kette	V β 17- und V α 2.3-Kette
ungefärbt	89	49 (55%)	48 (54%)
fluoreszenzgefärbt	90	20 (22%)	15 (16,7%)
AP gefärbt	90	14 (15,5%)	6 (6,7%)

Tabelle 3: Analyse ungefärbter sowie gefärbter COP-1-Einzelzellen durch Einzelzell-RT-PCR

Nach Isolation der COP-1-Einzelzellen wurden diese durch Einzelzell-RT-PCR analysiert. Die Analyse ergab für die ungefärbten Zellen eine wesentlich höhere Effizienz (54%) als für die gefärbten Zellen (fluoreszenzgefärbt: 16,7%, AP-gefärbt: 6,7%).

Das Ergebnis zeigt, dass wir bei 55% der ungefärbten Zellen ein PCR-Produkt detektieren konnten. Fast alle Zellen, die eine β -Kette zeigten waren auch positiv für die α -Kette. Eine Färbung der Zellen setzt die Effizienz der PCR-Methode deutlich herab, wobei die Färbung mit fluoreszenzmarkierten AK (16,7%) ein besseres Ergebnis zeigt als die Färbung mit alkalischer Phosphatase (6,7%).

Abb. 20 zeigt einen Teil der TZR- β -Ketten-Analyse isolierter COP-1-Einzelzellen. Die Amplifikation der TZR-V β 17-Kette mit klonspezifischen Primern lieferte das erwartete Produkt von 150bp.

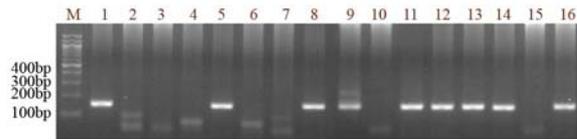


Abb. 20: Analyse der TZR- β -Kette isolierter COP-1-Einzelzellen mit Einzelzell-PCR

Dargestellt ist eine Auswahl analysierter COP-1-Einzelzellen. Die isolierten Zellen wurden mit klonspezifischen Primern gegen die V β 17-J β 2.3-TZR-Kette untersucht. Das erwartete PCR-Produkt wies eine Größe von 150bp auf. Die Spuren 1,5,8,9,11-14 und 16 zeigen eine Bande in der richtigen Höhe.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1-16: mit Einzelzell-PCR analysierte COP-1 Einzelzellen

Wir überprüften die amplifizierte Sequenz entweder durch Sequenzierung oder durch einen Testverdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII* (Abb. 21). Das Enzym trennt ca. 14bp des amplifizierten PCR-Produkts ab, sodass nur ein geringer Shift auf dem Agarosegelbild zu erkennen ist.

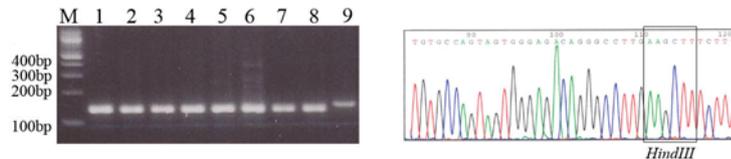


Abb. 21: Überprüfung der V β 17-PCR-Produkte der analysierten COP-1-Einzelzellen durch einen *HindIII*-Restriktionsverdau und die dazugehörige Nukleotidsequenz

Die PCR-Produkte der durch die β -PCR analysierten COP-1-Einzelzellen wurden durch einen Restriktionsverdau mit *HindIII* auf ihre Richtigkeit überprüft. Das korrekt verdaute PCR-Produkt zeigt einen kleinen Shift nach unten im Vergleich zur unverdauten Kontrolle.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1-8: mit *HindIII* verdaute V β 17-PCR-Produkte der analysierten COP-1-Einzelzellen

Spur 9: unverdaute Kontrolle

Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt der V β 17-Kette der COP-1-Zellen mit der verwendeten *HindIII*-Schnittstelle.

Die Amplifikation der TZR- α -Kette mit den universellen Primer Sets lieferte ein Signal in den Sets c und d (Abb. 22a). Dies ist durchaus möglich, da durch die große Anzahl eingesetzter Primer und durch die Ähnlichkeit der Primer untereinander die gleiche Sequenz von zwei verschiedenen Primern amplifiziert werden kann. Die PCR-Produkte wurden ebenfalls entweder durch Sequenzierung oder durch Restriktionsverdau mit *SmaI* auf ihre Richtigkeit überprüft. Der *SmaI*-Verdau der TZR- α -Kette spaltet das PCR-Produkt in ein 110bp sowie ein 50bp großes Fragment (Abb. 22b).

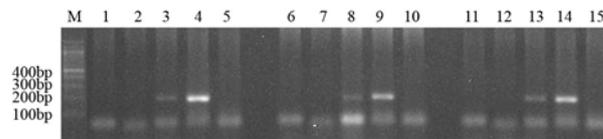


Abb. 22a: Analyse der TZR- α -Kette $V\beta 17^+$ -COP-1-Einzelzellen mit Einzelzell-PCR

Die $V\beta^+$ -COP-1-Zellen wurden mit den $V\alpha$ -Primer Sets a-e auf die gepaarte α -Kette untersucht. Das Agarosegel zeigt drei Beispiele. Das Signal in zwei Sets (c und d) ist darauf zurückzuführen, dass dieselbe Sequenz durch verschiedene Primer amplifiziert werden kann, da sich manche Primer für verschiedene $V\beta$ -Familien sehr ähnlich sind.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1-5: mit den Primer Sets a-e analysierte COP-1-Einzelzelle

Spur 6-10: mit den Primer Sets a-e analysierte COP-1-Einzelzelle

Spur 11-12: mit den Primer Sets a-e analysierte COP-1-Einzelzelle

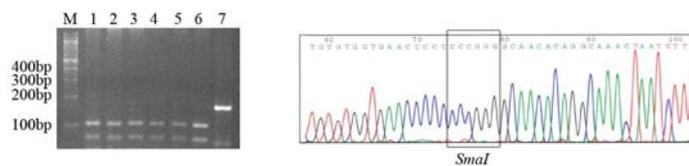


Abb. 22b: Überprüfung der $V\alpha 2.3$ -PCR-Produkte der analysierten $V\beta 17^+$ -COP-1-Einzelzellen durch einen $SmaI$ -Restriktionsverdau und die dazugehörige Nukleotidsequenz

Die PCR-Produkte aus der α -PCR wurden durch einen Restriktionsverdau mit $SmaI$ auf ihre Richtigkeit überprüft. Das korrekt verdaute PCR-Produkt zeigt zwei Banden bei 110bp bzw. 50bp im Gegensatz zur unverdauten Kontrolle.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1-6: mit $SmaI$ verdaute $V\alpha 2.3$ -PCR-Produkte der analysierten COP-1-Einzelzellen

Spur 7: unverdaute Kontrolle

Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt der $V\alpha 2.3$ -Kette der COP-1-Zellen mit der verwendeten $SmaI$ -Schnittstelle.

3.1.2 Effizienz für die Amplifikation eines dualen TZR

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, exprimieren 2-30% der T-Lymphozyten zwei TZR- α -Ketten, d.h. eine β -Kette ist mit zwei verschiedenen α -Ketten kombiniert (Padovan et al., 1993; He et al., 2002; Prinz et al., 2002). Umstritten ist jedoch, ob die Zelle wirklich beide TZR als funktionelles Molekül auf der Oberfläche exprimiert, da man die zweite α -Kette meist nur auf RNA-Ebene nachweisen konnte (Padovan et al., 1993; Prinz et al., 2002). Aus diesem Grund haben wir zusätzlich getestet, ob es theoretisch möglich wäre mit der dargestellten Methode zwei TZR- α -Ketten gleichzeitig zu amplifizieren. Hierfür haben wir wie bereits erwähnt neben der $V\beta 17$ -Transfektante COP-1 ein weiteres Maus-Hybridom verwendet, das den TZR $V\beta 22$ - $V\alpha 9$ exprimiert (BBC9). Diese Zellen wurden ebenfalls durch Cytospin auf Objektträger immobilisiert. Um T-Zellen mit zwei α -Ketten zu simulieren, haben wir je eine Zelle des $V\beta 17$ - und eine des $V\beta 22$ -Hybridoms gemeinsam in den Deckel eines PCR-Reaktionsgefäßes katapultiert und durch die Einzelzell-RT-PCR analysiert.

In 60 der 90 analysierten Zellen konnten wir sowohl die COP- β -Kette als auch beide TZR- α -Ketten detektieren. Dies beweist, dass eine eventuell vorhandene zweite α -Kette mit großer Wahrscheinlichkeit detektiert werden würde. Die PCR-Produkte wurden wiederum mittels Restriktionsverdau mit *HindIII* (siehe Abb. 21) für die β -Kette und *MspI* für die beiden α -Ketten überprüft (Abb. 23).



Abb. 23: Überprüfung der $V\alpha 2.3$ - sowie der $V\alpha 23$ -PCR-Produkte der analysierten COP-1 bzw. BBC9-Einzelnzellen durch einen *MspI*-Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte aus der α -PCR wurden durch einen Restriktionsverdau mit *MspI* auf ihre Richtigkeit überprüft. Die korrekt verdaute COP- α -Kette zeigt eine Doppelbande bei etwa 100 bp. Die korrekt verdaute BBC- α -Kette zeigt eine Bande bei 68bp bzw. 154bp.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1-18: mit *MspI* verdaute $V\alpha 2.3$ -sowie $V\alpha 23$ -PCR-Produkte der analysierten COP-1- bzw. BBC9-Einzelnzellen

Spur 19: unverdaute Kontrolle

Durch *MspI*-Restriktionsverdau konnten wir gleichzeitig sowohl die COP-1 als auch die BBC9-TZR- α -Kette testen. Verdaute COP-Sequenzen ergaben eine Doppelbande bei ca. 100bp, die verdaute BBC-Sequenz zeigte eine Bande bei 68bp bzw. 154bp. Das Gelbild zeigt, dass in den meisten Proben sowohl ein PCR-Produkt der COP- α -Kette als auch der BBC- α -Kette vorhanden war. In einigen trat entweder die COP- oder die BBC-TZR- α -Kette auf.

3.2 Analyse der $V\beta 1^+$ Einzelzellen des Patienten PM16488

Nachdem wir die Effizienz der Einzelzell-RT-PCR-Methode an einem Modell-System bestimmt hatten, wurden anschließend alle vom Patienten PM16488 isolierten $V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten analysiert. Nach der RT-Reaktion sowie der $\alpha\beta$ -Prä-Amplifikation wurden die Zellen zunächst mit klonspezifischen Primern ($V\beta$ -1-for-out - 16488 β -rev-out sowie $V\beta$ -1-for-in - 16488 β -rev-in) auf die TZR- β -Kette untersucht. Nur die positiven Zellen wurden mit den universellen Primer Sets a-e auf eine korrespondierende TZR- α -Kette analysiert ($V\alpha$ -X₁₋₂₄ - for-out - C α -rev-out sowie $V\alpha$ -set a-e - C α -rev-in; siehe Material und Methoden II.1.6.1).

In 64 der 1230 $V\beta 1^+$ -Zellen konnten wir die korrekte TZR- β -Kette detektieren (5,2%).

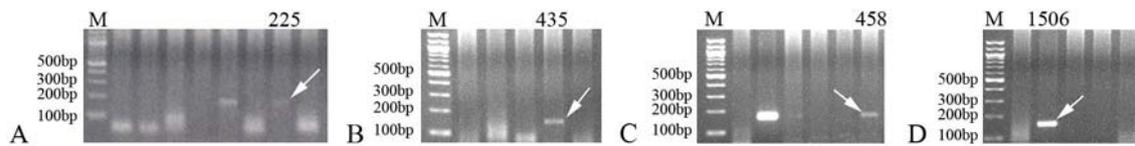


Abb. 24: PCR-Produkte analysierter $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positiver Einzelzellen des Patienten PM16488

Die isolierten Zellen wurden mit klon-spezifischen Primern gegen die expandierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -TZR-Kette analysiert. Dargestellt ist die Analyse von vier Zellen, die sowohl für die β -Kette als auch später für die α -Kette ein positives Ergebnis zeigten. Die entsprechende Bande ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

A: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 225: mit Einzelzell-PCR analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 225

B: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 435: mit Einzelzell-PCR analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 435

C: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 458: mit Einzelzell-PCR analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 458

D: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1506: mit Einzelzell-PCR analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 1506

Abb. 24 zeigt die PCR-Produkte der untersuchten Zellen 225, 435, 458 sowie 1506 der TZR- β -Ketten-Amplifikation, die bei weiterer Analyse eine gepaarte TZR- α -Kette aufwiesen. Die PCR-Produkte haben eine Größe von etwa 160bp. Zur Bestätigung der korrekten Nukleotidabfolge wurden die PCR-Produkte sequenziert (Abb. 25). Die Nukleotidabfolge stimmt mit der in Abb. 10a gezeigten Sequenz des CDR3-Spektratypes überein. Mit allen anderen aufgetretenen PCR-Produkten verfuhr man in gleicher Weise.

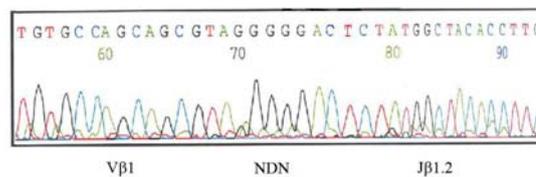


Abb. 25: Ausschnitt der $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -Nukleotidsequenz des Patienten PM16488

Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt der expandierten TZR- β -Kette $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ des Patienten PM16488, erhalten aus analysierten Einzelzellen.

Wir untersuchten die 64 positiven Zellen nun auf eine korrespondierende TZR- α -Kette. Da nicht bekannt ist, welche α -Kette mit der β -Kette paart, setzten wir wie oben bereits erwähnt universelle Primer Sets ein. Mit diesen Primer Sets war es möglich, alle theoretisch existierenden TZR- α -Ketten zu amplifizieren.

In neun der 64 $V\beta 1^+$ -Zellen konnte eine korrespondierende TZR- α -Kette gefunden werden (0,7%), wobei sechs Zellen dieselbe $V\alpha 2.2$ - $J\alpha 54$ (Zellen 435, 504, 1049, 1085, 1235, 1246) aufwiesen. Die anderen drei Zellen zeigten eine $V\alpha 11$ - $J\alpha 31$ (Zelle 225), $V\alpha 20$ - $J\alpha 37$ (Zelle 458) sowie eine $V\alpha 23$ - $J\alpha 40$ (Zelle 1506).

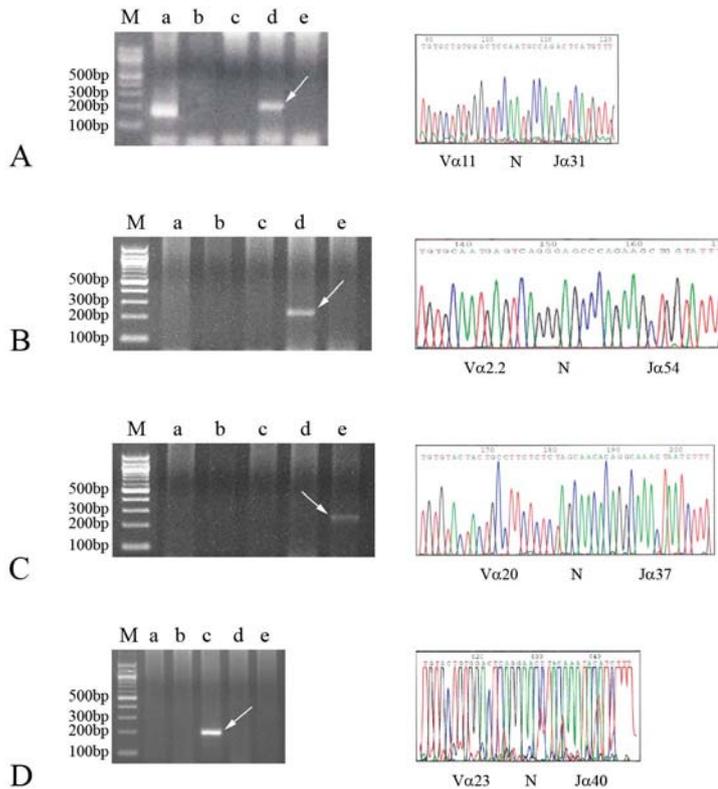


Abb. 26: PCR-Produkte analysierter $V\alpha$ -positiver Einzelzellen des Patienten PM16488 und die dazugehörige Nukleotidsequenz

Alle β^+ -Zellen wurden mit den α -Primer Sets a-e auf eine gepaarte α -Kette analysiert. Gezeigt ist die Analyse von vier Zellen, die jeweils eine unterschiedliche α -Kette exprimieren. Die entsprechende Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Nukleotidsequenz zeigt je einen Ausschnitt aus der detektierten TZR- α -Kette.

A: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur a-e: mit den Primer Sets a- e analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 225

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 11$ - $J\alpha 31$ -Kette

B: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur a-e: mit den Primer Sets a- e analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 435

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 2.2$ - $J\alpha 54$ -Kette

C: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur a-e: mit den Primer Sets a- e analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 458

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 20$ - $J\alpha 37$ -Kette

D: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur a-e: mit den Primer Sets a- e analysierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -positive Einzelzelle Nummer 1506

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 23$ - $J\alpha 40$ -Kette

Abb. 26 zeigt die PCR-Produkte sowie die Nukleotidsequenz der TZR- α -Ketten. Es sind lediglich die Ergebnisse von vier Zellen dargestellt, die jeweils eine der vier unterschiedlichen α -Ketten exprimierten. Mit allen weiteren Kandidaten verfuhr man ebenso.

Um die detektierten α -Ketten zu bestätigen und möglicherweise noch weitere Paarungen zu finden, untersuchten wir jede einzelne Zelle der 64 β^+ -Zellen nochmals mit klonspezifischen Primern für die bereits detektierten vier TZR- α -Ketten (16488 $V\alpha 2.2$ -for-spec - 16488 $V\alpha 2.2$ -

rev-spec; V α -11-for-in - 16488 α 11-rev-spec; V α -20-for-in - 16488 α 20-rev-spec; V α -23-for-in - 16488 α 23-rev-spec; II.1.6.1).

Dadurch konnten wir in den Zellen 225, 435, 458, 504, 1049, 1085, 1235, 1246, 1506 die bereits gefundenen α -Ketten bestätigen, sowie in 14 Zellen eine weitere V α 2.2-J α 54 detektieren (1,9%). Die detektierten Gelbanden der V α 2.2-J α 54 TZR-Kette sind in Abb. 27 dargestellt. Die anderen drei α -Ketten traten nicht noch einmal auf.

Die Dominanz des TZR-Klons V β 1-V α 2.2 ist ein Hinweis auf seine pathogene Relevanz.

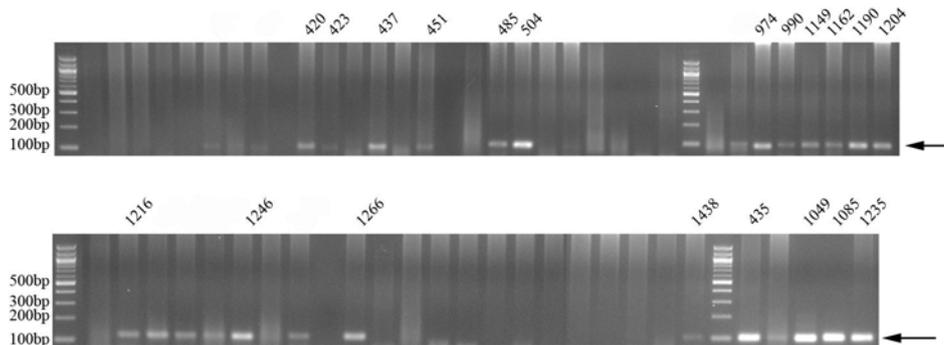


Abb. 27: Analyse V β 1-J β 1.2 positiver Einzelzellen des Patienten PM16488 mit klonspezifischen Primern gegen die V α 2.2-J α 54-TZR-Kette

Alle β^+ -Zellen wurden nochmals mit klonspezifischen Primern gegen die bereits detektierten α -Ketten analysiert. Dargestellt ist die Analyse mit den Primern gegen die V α 2.2-J α 54-Kette. Die Lage der erwarteten PCR-Produkte ist mit einem Pfeil markiert.

Alle mit Zahlen gekennzeichneten Spuren zeigen sowohl ein positives PCR-Produkt als auch die korrekte Sequenz der α -Kette in der anschließenden Sequenzierung.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz der vier detektierten TZR- α -Ketten (Abb. 28) wird deutlich, dass drei Ketten eine Homologie in der CDR3-Region aufweisen. Lediglich die V α 23-J α 40-Kette fällt wegen ihrer negativ geladenen Asparaginsäure (D) aus dem Muster. Die Aminosäuren der anderen Ketten sind alle klein und hydrophil. Da, wie in der Einleitung bereits erwähnt, die Bindung zwischen Antigen und TZR hauptsächlich über die CDR3-Region geschieht, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die drei TZR ein ähnliches Antigen erkennen.

Vα 2.2	CAMSQGAQ--	-KLVF	Jα54
Vα 11.1	CAVGSNA--	-RLMF	Jα31
Vα 20.1	CLLSSNTG--	-KLIF	Jα37
Vα 23.1	CAVD ^S SGTY--	-KYIF	Jα40

Abb. 28: Vergleich der Aminosäuresequenz der CDR3-Region der vier detektierten TZR- α -Ketten

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der CDR3-Region der vier detektierten TZR- α -Ketten. Alle zeigen eher kleine und hydrophile Aminosäuren mit Ausnahme der negativ geladenen Asparaginsäure in der V α 23-J α 40-Kette.

Orange: konsensus Region; Grün: CDR3-Region; Grau: N-Region

3.3 Analyse der V β 23⁺ Einzelzellen des Patienten IBM15551

Die 250 V β 23⁺-Zellen des Patienten IBM15551 wurden ebenfalls mit dem gleichen Verfahren der Einzelzell-RT-PCR analysiert.

In acht der 250 Zellen konnten wir die aus dem CDR3-Spektrotyping bekannte expandierte TZR- β -Kette V β 23-J β 1.1 detektieren (3,2%). Zwei der acht Zellen wiesen eine gepaarte TZR- α -Kette auf (0,8%), eine V α 4.2-J α 47 (Zelle 149) sowie eine V α 23.1-J α 39 (Zelle 231). Die nochmalige Analyse der acht V β 23⁺-Zellen mit klonspezifischen Primern für V α 4.2 sowie V α 23 ergaben keine neuen $\alpha\beta$ -Paarungen.

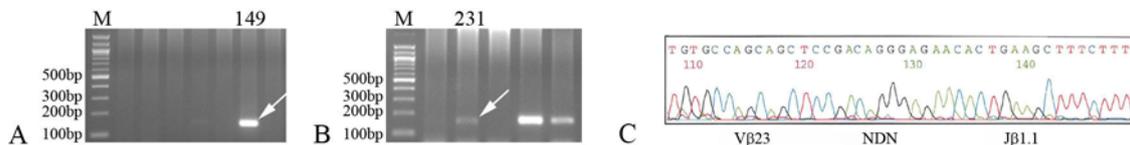


Abb. 29: PCR-Produkte analysierter V β 23-J β 1.1-positiver Einzelzellen des Patienten IBM15551 und die dazugehörige Nukleotidsequenz

Die isolierten Zellen wurden mit klonspezifischen Primern gegen die expandierte V β 23-J β 1.1-TZR-Kette analysiert. Dargestellt ist die Analyse von zwei Zellen, die sowohl für die β -Kette als auch später für die α -Kette ein positives Ergebnis zeigten. Die entsprechende Bande ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

A: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 149: mit Einzelzell-PCR analysierte V β 23-J β 1.1-positive Einzelzelle Nummer 149

B: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 231: mit Einzelzell-PCR analysierte V β 23-J β 1.1-positive Einzelzelle Nummer 231

Die Nukleotidsequenz zeigt einen Ausschnitt der expandierten TZR- β -Kette V β 23-J β 1.1 des Patienten IBM15551, erhalten aus analysierten Einzelzellen.

Abb. 29 zeigt die PCR-Produkte der β -Ketten-Analyse der Zellen 149 und 231 sowie deren Nukleotidsequenz. Beide Zellen lieferten die korrekte expandierte V β 23-J β 1.1-Sequenz sowie eine gepaarte TZR- α -Kette, gezeigt in Abb. 30. In Zelle 149 wurde eine V α 4.2-J α 47 in Zelle 231 eine V α 23-J α 39 identifiziert.

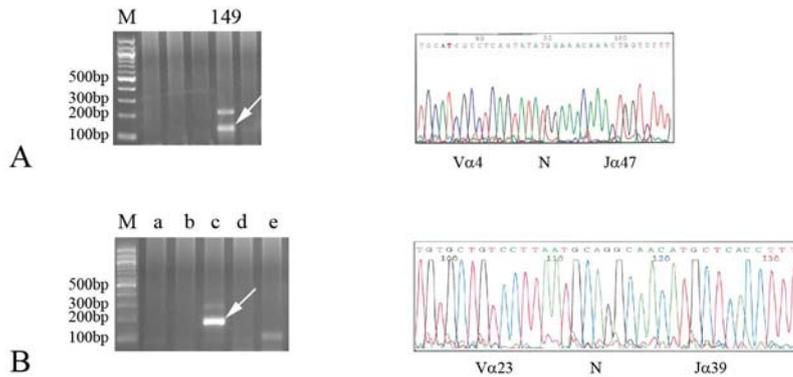


Abb. 30: PCR-Produkte analysierter $V\alpha$ -positiver Einzelzellen des Patienten IBM15551 und die dazugehörige Nukleotidsequenz

Alle β^+ -Zellen wurden mit den $V\alpha$ -Primer Sets *s* a-e auf eine gepaarte α -Kette analysiert. Gezeigt ist die Analyse von zwei Zellen, die jeweils eine unterschiedliche α -Kette exprimieren. Die entsprechende Bande ist mit einem Pfeil markiert. Die Nukleotidsequenz zeigt je einen Ausschnitt aus der detektierten TZR α -Kette.

A: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 149: mit Einzelprimern analysierte $V\beta 23$ - $J\beta 1.1$ -positive Einzelzelle Nummer 149

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 4$ - $J\alpha 47$ -Kette

B: Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur a-e: mit den Primer Sets a- e analysierte $V\beta 23$ - $J\beta 1.1$ -positive Einzelzelle Nummer 231

Ausschnitt der Nukleotidsequenz der $V\alpha 23$ - $J\alpha 39$ -Kette

3.4 Analyse der $V\beta 1^+$ Einzelzellen des MS-Patienten FE

Beim MS-Patienten FE untersuchten wir zunächst die isolierten Blutzellen. In 53 der 2500 $CD8^+/V\beta 1^+$ -T-Lymphozyten detektierten wir die aus dem Spektratyping bekannte expandierte $V\beta 1$ - $J\beta 2.3$ -TZR-Kette (2,2%). In vier Zellen wurde eine identische $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 16$ gefunden (0,16%).

Aufgrund dieses α -Ketten-Verdachts analysierten wir 115 $V\beta 1^+$ -Zellen aus dem Hirngewebe mit klonspezifischen Primern gegen die $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 16$ TZR-Kette anstatt mit den standardmäßig verwendeten universellen Primer Sets ($V\alpha 7.2$ - Fe AV7.2J16-rev-2; $V\alpha 7$ Fe-2 - Fe AV7.2J16-rev-3; $V\alpha 7$ Fe-3 - Fe AV7.2J16-rev-4; II.1.6.1.5). Es konnten 15 Zellen mit der korrekten β -Kette (13%), jedoch keine korrespondierende α -Kette gefunden werden.

Nach Verbesserung des Färbeprotokolls (siehe II.3.3.2) wurden erneut 83 $V\beta 1^+$ -Zellen aus dem Hirngewebe isoliert und analysiert. Da sich der α -Ketten-Verdacht nicht bestätigt hatte, wurden für diese Analyse wieder die Primer Sets eingesetzt. Somit bestand die Möglichkeit wieder alle α -Ketten detektieren zu können. Wir fanden in neun Zellen eine β -Kette (10,8%) jedoch keine korrespondierende α -Kette.

4. Klonierung der rekombinanten TZR-Sequenzen des Patienten PM16488 in Expressionsvektoren

4.1 Klonierungsstrategie

Nach der Analyse aller isolierten T-Lymphozyten durch die Einzelzell-RT-PCR, wurden die interessanten TZR-Ketten rekonstruiert und in Expressionsvektoren kloniert. Da der Patient PM16488 mit den vier verschiedenen TZR das vielversprechenste Ergebnis lieferte, wurden diese TZR-Ketten kloniert.

Für die Klonierung amplifizierten wir die einzelnen Teile der TZR- α - bzw. β -Kette durch PCR. Als Template für die V- bzw. J-Region diente die Lymphozyten-cDNA eines unbeteiligten Spenders, da jeder Mensch das gesamte Repertoire an TZR-V bzw. J-Regionen exprimiert. Als Template des spezifischen N(D)N-Bereichs diente das PCR-Produkt aus der Einzelzell-RT-PCR. Mit Hilfe der eingesetzten Oligonukleotide wurden jeweils am 3'- sowie am 5'-Ende entweder neue Restriktionsschnittstellen eingeführt oder die bereits in der Sequenz vorhandenen Schnittstellen verwendet. Mithilfe dieser Schnittstellen erfolgte anschließend die Ligation der drei Fragmente und die Klonierung in den entsprechenden Expressionsvektor. Die TZR- α -Kette wurde in den pRSV5hygro-Vektor eingesetzt, die TZR- β -Kette nach einer Zwischenklonierung in den Vektor pBRdel in den Endvektor pRSV5neo.

4.2 Klonierung der TZR- $\alpha\beta$ -Ketten

4.2.1 Klonierung der V β 1-TZR-Kette in den Vektor pRSV5neo

Wir amplifizierten die im CDR3-Spektratyping expandierte TZR-Kette V β 1-J β 1.2 in drei PCR-Reaktionen mithilfe der im Material- und Methodenteil aufgeführten Oligonukleotide (C_BV1_SalI lead - C_BV1_SacI rev; C_BV1_SacI for - C_BV1_AflIII rev; C_BV1_AflIII for - C_BV1_BglII rev; II.1.6.2.1). Wir verdauten die erhaltenen PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und ligierten diese. Nach einer erneuten PCR-Reaktion auf die Ligation erhielten wir eine ausreichende Menge der kompletten TZR- β -Kette, um diese in den Zwischenvektor pBRdel klonieren zu können.

Der verwendete Zwischenvektor pBRdel (Abb. 31) enthält die komplette Sequenz einer TZR- β -Kette einschließlich des konstanten Teils. Da die konstante Region aller β -Ketten identisch ist, konnte das zuvor klonierte Produkt, welches lediglich aus dem V-NDN-J-Teil der TZR- β -Kette bestand, durch Restriktionsverdau mit *SalI* und *BglII* und anschließender Ligation ausgetauscht werden.

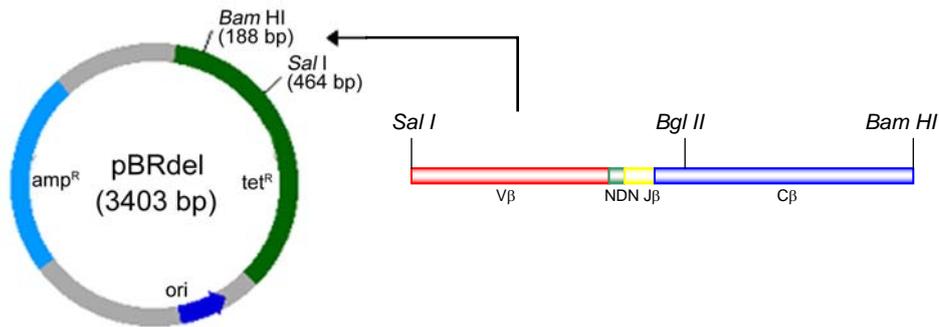


Abb. 31: Schematische Darstellung des Subklonierungsvektors pBRdel

Über die *Sal I*- und *Bgl II*-Schnittstellen konnten die rekombinierten *V*-*NDN*-*J*-DNA-Sequenzen der β -Ketten ausgetauscht und dabei in pBRdel mit der Sequenz des konstanten Bereichs zu vollständig kodierenden TZR-Ketten verbunden werden.

Anschließend transformierten wir den Vektor mit dem $V\beta 1$ -TZR-Fragment mittels Elektroporation (II.2.2.2) in DH5 α -Bakterienzellen, isolierten am folgenden Tag Kolonien von der Agarplatte und detektierten positive Klone mittels PCR-Screening. Zwei Klone wurden ausgewählt und nochmals durch Sequenzierung überprüft.

Nun konnte die komplette TZR- β -Kette aus dem Zwischenvektor pBRdel mittels *SalI*-*BamHI*-Restriktionsverdau herausgeschnitten und in den ebenfalls *SalI*-*BamHI* geschnittenen Zielvektor pRSV5neo hineinkloniert werden (Abb. 32).

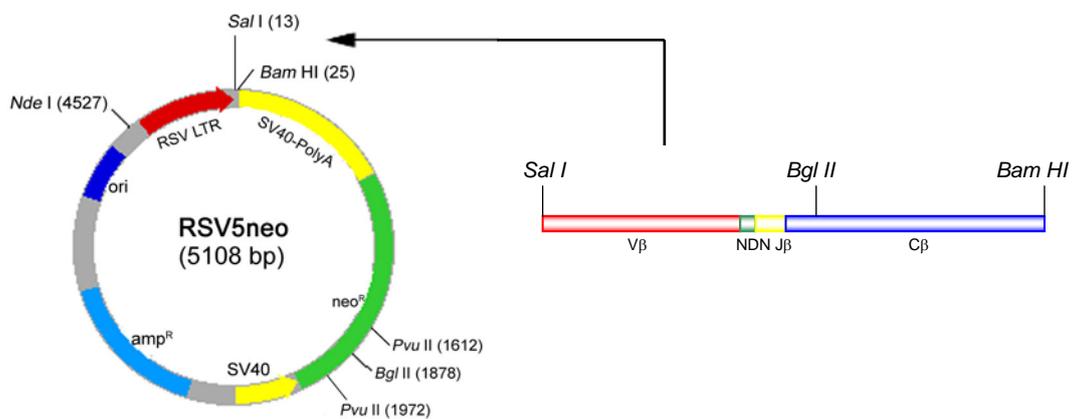


Abb. 32: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pRSV5neo

Aus dem Subklonierungsvektor pBRdel wurden die vollständigen TZR-DNA-Sequenzen über die Schnittstellen *Sal I* und *Bam HI* herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pRSV5neo umklontiert.

Wir analysierten die erhaltenen Klone durch PCR-Screening und überprüften jeweils zwei ausgewählte Klone durch Sequenzierung.

Nach Bestätigung der Sequenz bereiteten wir die Kette für die Transfektion in die Maus-Hybridomzelllinie vor.

4.2.2 Klonierung der TZR- α -Ketten in den Vektor pRSV5hygro

Die Klonierung der vier TZR- α -Ketten V α 2.2-J α 54 (Zelle 435), V α 11-J α 31 (Zelle 225), V α 20 -J α 37 (Zelle 458) sowie V α 23-J α 40 (Zelle 1506) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Klonierung der TZR-Kette V β 1-J β 1.2, jedoch ohne Zwischenklonierung in den Vektor pBRdel. Die α -Ketten wurden sofort nach Amplifikation und Ligation in den Expressionsvektor pRSV5hygro kloniert, der wiederum bereits den konstanten Teil der TZR- α -Kette enthielt. Die Primer für die Rekonstruktion sind im Material und Methodenteil unter II.1.6.2.1 aufgeführt.

Als Beispiel ist hier die Klonierung der TZR- α -Kette V α 2.2-J α 54 aufgeführt. Durch eine günstige Platzierung der Oligonukleotide war es möglich, die TZR-Kette aus zwei und nicht aus drei Fragmenten zusammzusetzen.

Nach Amplifikation beider Fragmente mit den Primern C_AV2_SalI lead gegen C_AV2_BsrDI rev sowie C_AV2_BsrDI for gegen C_AV2_PvuII rev, verdauten wir diese mit dem Restriktionsenzymen *BsrDI* und ligierten sie miteinander. Nach Amplifikation des Ligationsproduktes und Restriktion mit *SalI* und *PvuII* klonierten wir das Fragment in den ebenfalls *SalI-PvuII* verdauten Expressionsvektor pRSV5hygro.

Die Ligation wurde in die Bakterienzellen DH5 α transformiert, die erhaltenen Kolonien durch PCR-Screening analysiert und ein korrekter Klon zur Transformation vorbereitet.

5. Expression der TZR- $\alpha\beta$ -Ketten im Maus-Hybridom 58 $\alpha\beta$

Nach der Rekonstruktion der β - sowie der vier α -Ketten des Patienten PM16488 konnten die V β 1-J β 1.2-Kette mit jeweils einer der vier α -Ketten in die Maus-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ mittels Elektroporation cotransfiziert werden. Der Vorteil dieser Hybridomzelllinie ist, dass sie selbst keinen eigenen TZR, jedoch den murinen CD3-Komplex sowie alle nötigen Moleküle zur Signalübertragung exprimiert. Lediglich den CD8-Corezeptor mussten wir, wie in II.4.6 beschrieben, zusätzlich in die Zelle transfizieren.

5.1 Cotransfektion der $\alpha\beta$ -Ketten

Vor der Transfektion wurde die TZR- β -Kette durch *NdeI*, die TZR- α -Ketten durch *XmnI* linearisiert und durch Ethanol/NaAcetat gefällt. Dies ist für die β -Kette sowie die V α 2.2-J α 54 in Abb. 33. dargestellt. Die Linearisierung der Ketten erleichtert den Einbau der TZR-Sequenz in das Genom der Zelle und somit eine stabile Expression des TZR.

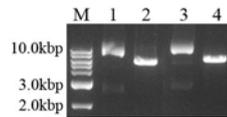


Abb. 33: Überprüfung der Linearisierung der $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -TZR-Kette durch Restriktionsverdau mit *NdeI* und der $V\alpha 2.2$ - $J\alpha 54$ -TZR-Kette durch Restriktionsverdau mit *XmnI*

Die TZR- α - und β -Kette wurde durch einen Restriktionverdau mit *NdeI* für die β -Kette und *XmnI* für die α -Kette linearisiert und der Erfolg auf einem Agarosegel überprüft.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1: unverdaute Kontrolle

Spur 2: mit *NdeI* linearisierte $V\beta 1$ - $J\beta 1.2$ -TZR-Kette

Spur 3: unverdaute Kontrolle

Spur 4: mit *XmnI* linearisierte $V\alpha 2.2$ - $J\alpha 54$ -TZR-Kette

Die Transfektion wurde wie unter II.4.5.1 beschrieben durchgeführt. Nach zwei bis drei Wochen G418- sowie Hygromycin B-Selektion expandierten einzelne Antibiotika-resistente Zellklone. Sie tolerierten auch Antibiotika-Konzentrationen, die weit über den Werten lagen, die wir bei untransfizierten $58\alpha\beta^-$ in Antibiotika-Konzentrationsreihen ermitteln konnten.

5.2 Charakterisierung der Transfektanten

5.2.1 Charakterisierung der Transfektanten mittels FACS-Analyse

Wir analysierten die isolierten Zellklone anschließend mittels FACS-Analyse auf ihre TZR-Oberflächenexpression. Hierfür verwendeten wir einen AK gegen die murine CD3 ϵ -Kette, sowie einen AK gegen die menschliche TZR- $V\beta 1$ -Region. Die TZR- α -Ketten konnten mittels FACS-Analyse nicht überprüft werden, da lediglich für die $V\alpha 2.3$, $V\alpha 12$ sowie die $V\alpha 24$ -Region ein AK erhältlich ist (Arstila et al.; 1999). Es ist jedoch bekannt, dass der TZR-Komplex nur an der Oberfläche exprimiert wird, wenn die α - und β -Kette des TZR sowie alle CD3-Ketten korrekt von der Zelle synthetisiert werden (Blumberg et al., 1990).

Abb. 34 zeigt beispielhaft die positive FACS-Analyse der Transfektante 435 ($V\beta 1$ - $V\alpha 2.2$). Die anderen Transfektanten zeigen ein identisches Ergebnis. Es tritt jeweils ein deutlicher Schift gegenüber der Isotypkontrolle sowohl bei der anti-CD3 ϵ - als auch der anti- $V\beta 1$ -Färbung auf. Dies beweist die TZR-Expression auf der Zelloberfläche. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich eine Färbung mit einem AK gegen die $V\beta 17$ -TZR-Kette durchgeführt, welche nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

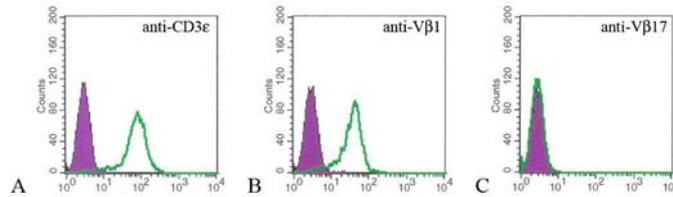


Abb. 34: FACS-Analyse der transfizierten Hybridomzellen zum Nachweis der CD3- bzw. Vβ1-Expression auf der Zelloberfläche am Beispiel der Transfektante 435 (Vβ1-Vα2.2)

In einer FACS-Analyse wurde die Oberflächenexpression des CD3- sowie des Vβ1-Moleküls der TZR-Transfektanten überprüft. Beispielhaft ist hier eine FACS-Analyse der Transfektante 435 (Vβ1-Vα2.2) dargestellt, welche ein positives Ergebnis zeigte. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung gegen eine nicht exprimierte TZR-β-Kette (Vβ17) durchgeführt.

A: Transfektante 435 nach Färbung mit dem AK gegen murines CD3

B: Transfektante 435 nach Färbung mit dem AK gegen humanes Vβ1

C: Transfektante 435 nach Färbung mit dem AK gegen humanes Vβ17 als Negativkontrolle

5.2.2 Charakterisierung der Transfektanten durch Aktivierung mittels Antikörper

Anschließend testeten wir die Klone auf ihre Aktivierbarkeit mittels AK. Dies erfolgte durch eine Aktivierung mit dem auch in der FACS-Analyse verwendeten AK gegen CD3ε. Die aktivierte Hybridomzelle gibt IL-2 ins Medium ab, das dann mittels IL-2-ELISA gemessen werden kann (II.4.10). Abb. 35 zeigt die Konzentration des IL-2 im Überstand der vier Transfektanten. Als Negativkontrolle wurde jeweils die Isotypkontrolle des CD3ε-AK mitgeführt (Hamster IgG).

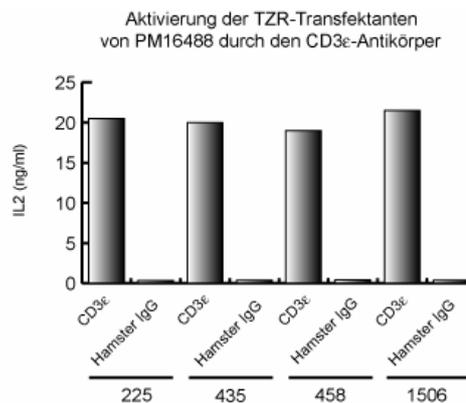


Abb. 35: IL-2-ELISA der vier TZR-Transfektanten nach Aktivierung durch den CD3-Antikörper

Durch eine Aktivierung mit dem CD3ε-AK wurde die Fähigkeit der Transfektanten, IL-2 zu sekretieren überprüft. Hierfür wurden die Zellen 13-16h in mit AK beschichteten 96-Lochplatten inkubiert und das ins Medium abgegebene IL-2 am nächsten Tag in einem IL-2-ELISA gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Hamster-Isotypkontrolle verwendet. Alle vier Transfektanten 225, 435, 458 und 1506 zeigten eine deutliche IL-2-Ausschüttung.

Auf der x-Achse sind die Namen der vier verschiedenen Transfektanten, auf der y-Achse die Menge an ausgeschüttetem IL-2 in ng/ml angegeben.

5.2.3 CD8-Transduktion der Transfektanten durch Retroviren

Anschließend wurde mittels retroviraler Transduktion die genetische Information für den menschlichen CD8-Corezeptor in die Maus-Hybridome gebracht. Hierfür verwendeten wir die Verpackungszelllinie GP+E 86, welche zuvor mit einem retroviralen Vektor, der das Gen für den menschlichen CD8-Corezeptor trägt, transfiziert wurde. Die Virionen, die nun von der Verpackungszelllinie produziert werden, infizieren die Zielzellen und das übertragene Gen wird exprimiert.

Die Transduktion wurde wie unter II.4.6 beschrieben durchgeführt und der Erfolg der Transduktion mittels FACS-Analyse überprüft. Hierfür verwendeten wir einen AK, der gegen die β -Kette des CD8-Moleküls gerichtet ist. Die erfolgreiche Virustransduktion ist in Abb. 36 dargestellt.

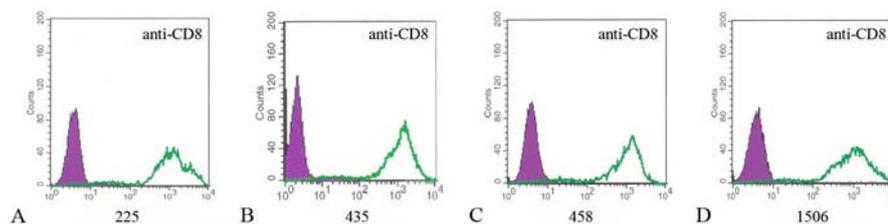


Abb. 36: FACS-Analyse der transfizierten Hybridomzellen zum Nachweis der CD8-Expression auf der Zelloberfläche

In einer FACS-Analyse wurde die Oberflächenexpression des CD8-Moleküls der TZR-Transfektanten nach der retroviralen Transduktion überprüft. Alle vier Transfektanten zeigten ein positives Ergebnis.

Mit diesen TZR- und CD8-positiven Transfektanten war nun eine Antigen suche möglich.

6. TZR JM22 als Modell-System für die Antigen suche

Als Modell für die Antigen suche klonierten wir einen weiteren TZR, der aus der Literatur als JM22 bekannt ist (Moss et al., 1991). Dieser TZR besteht aus einer V α 10-J α 42- sowie einer V β 17-J β 2.7-Kette. Er erkennt das Peptid 58-66 (GILGFVFTL) des Influenza A Matrix Proteins, genannt flu, wenn dieses auf HLA-A*02 präsentiert wird. Das flu-Antigen wurde sowohl als synthetisches Peptid eingesetzt als auch in ein Expressionsplasmid kloniert und in die APZ transfiziert. Der Einsatz des synthetischen Peptids simuliert die Zugabe der Library-Peptidmische zu den Zellen. Es erfolgt hier eine Beladung der MHC-Klasse I-Moleküle von außen. Bei der Transfektion des flu-Konstruktes in die HLA-A*02 positiven APZ wird das Peptid in der Zelle auf MHC-I-Moleküle gebunden und über den MHC-Klasse I-Präsentationsweg auf der Zelloberfläche präsentiert.

6.1 Klonierung der TZR- $\alpha\beta$ -Kette und Expression im Maus-Hybridom 58 $\alpha\beta$

Die Klonierung der α - und β -Kette des TZR JM22 erfolgte mit den im Material- und Methodenteil unter II.1.6.2.2 aufgeführten Oligonukleotiden (JM22 Vbeta for; JM22 VJbeta rev; JM22 AV10 lead; JM22 VJalpha rev; JM22 Jalpha for).

Die TZR- β -Kette V β 17-J β 2.7 konnte mittels geschickter Auswahl an Oligonukleotiden aus zwei bereits vorhandenen TZR-Konstrukten zusammengefügt werden. Die TZR- α -Kette V α 10-J α 42 wurde komplett aus Lymphozyten-cDNA eines unbeteiligten Spenders amplifiziert.

Nach Elektroporation in DH5 α -Bakterienzellen konnten wir positive Klone mittels PCR-Screening detektieren und durch Sequenzierung überprüfen.

Anschließend transfizierten wir die beiden linearisierten und gefällten TZR-Ketten wie die TZR-Ketten des Patienten PM16488 durch Elektroporation in die Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$. Die nach zwei bis drei Wochen auftretenden einzelnen Antibiotika-resistenten Zellklone wurden isoliert und charakterisiert.

Wie in III.5.2 bereits beschrieben charakterisierten wir die erhaltenen Zellklone durch FACS-Analyse sowie Aktivierung mittels AK. Für die FACS-Analyse verwendeten wir den AK gegen die murine CD3 ϵ -Kette sowie den AK gegen die menschliche V β 17-Region. Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit dem AK gegen die V β 1-Region, welche nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Aktivierung der Transfektante erfolgte durch den anti-CD3 ϵ -AK. Als Negativkontrolle wurde die Isotypkontrolle Hamster IgG eingesetzt.

Die FACS-Analyse in Abb. 37a zeigten einen deutlichen Schift sowohl bei der CD3 ϵ - als auch der V β 17-Färbung gegenüber der Isotypkontrolle. Dies beweist eindeutig die Expression der TZR-Moleküle auf der Zelloberfläche.

Auch die IL-2-Abgabe der Maus-Hybridome nach der AK-Aktivierung gemessen durch einen IL-2-ELISA zeigt eine ausreichende Funktionalität der Transfektante Abb. 37b.

Wie unter Punkt III.5.2.3 bereits beschrieben, wurde auch die JM22-Transfektante durch retrovirale Transduktion mit dem humanen CD8-Corezeptor transduziert und der Erfolg mittels FACS-Analyse mit dem AK gegen die β -Kette des CD8-Moleküls überprüft (Ergebnis hier nicht gezeigt).

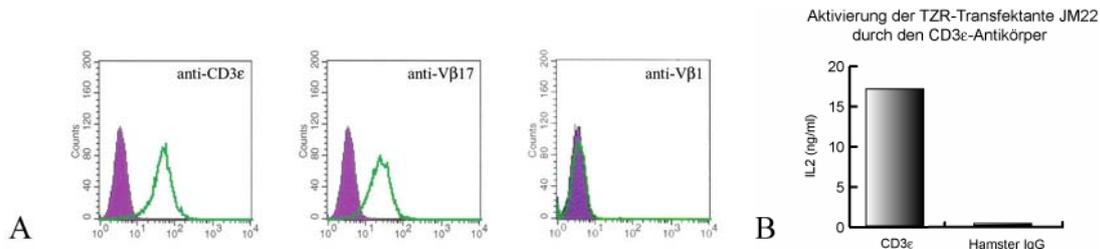


Abb. 37a: FACS-Analyse der JM22-TZR-Transfektante zum Nachweis der CD3- bzw. Vβ17-Expression auf der Zelloberfläche

In einer FACS-Analyse wurde die Oberflächenexpression des CD3- sowie des Vβ17-Moleküls der TZR-Transfektante JM22 überprüft, welche ein positives Ergebnis zeigte. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung gegen eine nicht exprimierte TZR-β-Kette (Vβ1) durchgeführt.

anti-CD3: JM22 nach Färbung mit dem AK gegen murines CD3

anti-Vβ17: JM22 nach Färbung mit dem AK gegen humanes Vβ17

anti-Vβ1: JM22 nach Färbung mit dem AK gegen humanes Vβ1 als Negativkontrolle

Abb. 37b: IL-2-ELISA der JM22-TZR-Transfektante nach Aktivierung durch den CD3-Antikörper

Durch eine Aktivierung mit dem CD3ε-AK wurde die Fähigkeit der Transfektante, IL-2 zu sekretieren überprüft. Hierfür wurden die Zellen 13-16h in mit AK beschichteten 96-Lochplatten inkubiert und das ins Medium abgegebene IL-2 am nächsten Tag in einem IL-2-ELISA gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Hamster-Isotypkontrolle verwendet. Die Transfektante JM22 zeigte eine deutliche IL-2-Ausschüttung.

6.2 Ermittlung der Empfindlichkeit des TZR JM22 durch Peptidtitration

Um herauszufinden, wie stark die JM22-Transfektante, durch das synthetische Peptid flu 58-66 aktiviert werden kann und welche Peptid-Konzentration am geeignetsten ist, führten wir eine Peptidtitration durch. Hierzu wurden HLA-A*02-positive LTK-Zellen ausgebracht und sechs Stunden mit unterschiedlichen flu-Peptid-Konzentrationen inkubiert bevor die JM22-Transfektante zugegeben wurde. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der IL-2-Konzentration in den Überständen.

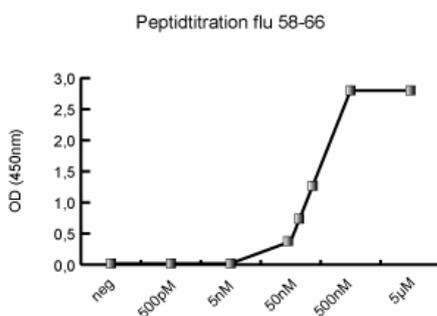


Abb. 38: Peptidtitrationskurve der Transfektante JM22 nach Aktivierung durch das synthetische flu-Peptid 58-66

Zur Überprüfung der Aktivierbarkeit der JM22 Transfektante durch das synthetische flu-Peptid 58-66, wurden HLA-A*02 positive LTK-Zellen 6h mit verschiedenen Konzentrationen an Peptid beladen und anschließend 13-16h mit der JM22 Transfektante inkubiert. Die Menge an ausgeschüttetem IL-2 wurde am folgenden Tag durch einen IL-2-ELISA gemessen.

Die x-Achse zeigt die Menge an eingesetztem flu-Peptid, die y-Achse die optische Dichte gemessen bei 450nm.

Abb. 38 zeigt die Peptidtitrationskurve der JM22-Transfektante aktiviert durch das synthetische flu-Peptid 58-66. Ab einer eingesetzten flu-Konzentration von 500nM erreicht das Signal einen Sättigungswert, weshalb diese Konzentration für zukünftige Versuche eingesetzt wurde. Ab einer Konzentration von weniger als 5nM ist kein Aktivierungssignal mehr zu detektieren.

Da wir nun sowohl die mit dem TZR des Patienten PM16488 transfizierten Maus-Hybridomzellen als auch die Modelltransfektante JM22 auf ihre Funktionalität getestet hatten, konnten wir mit der Suche nach einem möglichen Peptid beginnen.

7. Versuch der Aktivierung der Transfektanten durch ein muskelspezifisches Autoantigen oder ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen

Zunächst untersuchten wir, ob die TZR-Moleküle des Patienten PM16488 möglicherweise ein muskelspezifisches Autoantigen oder ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen erkennen. Hierzu wurden die menschliche Rhabdomyosarkom Zelllinie TE671 und die autologen EBV-B-Zellen des Patienten PM16488 mit den TZR-transfizierten Maus-Hybridomzellen kokultiviert und eine mögliche Aktivierung im IL-2-ELISA gemessen.

7.1 Versuch der Aktivierung durch ein muskelspezifisches Autoantigen der menschlichen Rhabdomyosarkom Zelllinie TE671

Ob es sich bei dem gesuchten AG um ein muskelspezifisches Peptid handelt, testeten wir mithilfe der menschlichen Rhabdomyosarkom Zelllinie TE671. Da die TE671-Zelllinie eine Muskelzelllinie ist, sollte das gesuchte Protein auch in diesen Zellen exprimiert und das präsentierte Peptid vom TZR-Transfektanten erkannt werden und diesen aktivieren. Da die Zelllinie jedoch nicht die patientenspezifischen HLA-Klasse-I-Moleküle exprimiert, transfizierten wir zunächst alle für den Patienten PM16488 spezifischen HLA-Konstrukte mittels Elektroporation in die Zellen.

7.1.1 Expression der HLA-Moleküle auf TE671-Zellen

Der Patient PM16488 exprimiert die HLA-Klasse I-Moleküle HLA-A*02, HLA-A*26, HLA-B*08, HLA-B*38, HLA-Cw*07 sowie HLA-Cw*1203. Die Detektion und Klonierung der HLA-Moleküle wurde durch einen Gastforscher durchgeführt, so dass die Plasmide für diese Arbeit bereits vorlagen. Nach Linearisierung der Plasmide mit *XmnI* wurden diese in die Transfektion eingesetzt. Die nach etwa 14 Tagen auftretenden Zellklone wurden isoliert, expandiert und auf ihre Expression getestet.

7.1.1.1 Charakterisierung der HLA-A*02-Transfektanten mittels FACS-Analyse

Eine vollständige Analyse der Oberflächenexpression war nur bei den HLA-A*02-Transfektanten möglich, da nur für dieses HLA-Molekül ein spezifischer AK vorhanden war. Alle anderen AK, z.B. solche, die gegen die gesamten HLA-A- oder HLA-B-Moleküle sowie alle MHC-Klasse I Moleküle gerichtet sind, zeigten Kreuzreaktivität mit den konstitutiv exprimierten HLA-Molekülen der Zelllinie und konnten daher nicht eingesetzt werden.

Wir testeten mittels FACS-Analyse einige HLA-A*02-Transfektanten mit diesem spezifischen AK auf ihre Oberflächenexpression.

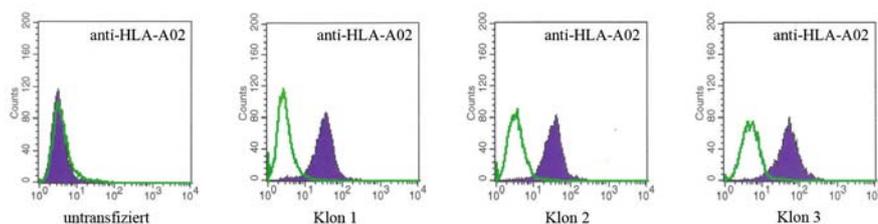


Abb. 39: FACS-Analyse der HLA-A*02-Transfektanten der Zelllinie TE671 zum Nachweis der HLA-Expression auf der Zelloberfläche

In einer FACS-Analyse wurde die Oberflächenexpression des HLA-A*02-Moleküls der TE671-Transfektanten überprüft. Beispielhaft sind hier drei der zwölf analysierten Transfektanten dargestellt, welche alle ein positives Ergebnis zeigten. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung untransfizierter TE671-Zellen durchgeführt.

Untransfiziert: untransfizierte TE671-Zellen nach Färbung mit dem AK gegen das menschliche HLA-Molekül HLA-A*02 (Negativkontrolle)

Klon 1-3: mit der HLA-A*02-Sequenz transfizierte TE671-Zellen nach Färbung mit dem AK gegen das menschliche HLA-Molekül HLA-A*02

Abb. 39 zeigt drei der zwölf untersuchten Transfektanten. Alle weisen eine deutliche Expression des HLA-A*02-Moleküls auf der Zelloberfläche auf. Die untransfizierten TE671-Zellen zeigen keine Färbung.

7.1.1.2 Nachweis der HLA-Expression auf RNA-Ebene

Der Nachweis der Expression der anderen HLA-Moleküle wurde auf RNA-Ebene durchgeführt. Zu diesem Zweck isolierten wir die RNA von jeweils drei Transfektanten eines HLA-Typs und schrieben diese in cDNA um (II.2.5). Anhand spezifischer Oligonukleotide für die einzelnen HLA-Moleküle, welche im Material- und Methodenteil aufgeführt sind (HLA-A02 for - HLA-A02 rev; HLA-A26 for - HLA-A26 rev; HLA-B08 for - HLA-B08 rev; HLA-B38 for - HLA-B38 rev; HLA-Cw07 for - HLA-Cw07 rev; HLA-Cw1203 for - HLA-Cw1203 rev), amplifizierten wir diese anschließend in einer PCR-Reaktion.

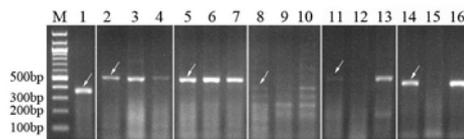


Abb. 40: Amplifikation der transfizierten HLA-Sequenzen des Patienten PM16488 aus der Zelllinie TE671

Zum Nachweis der Expression der HLA-Moleküle mittels PCR wurde die RNA der verschiedenen Transfektanten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für die einzelnen HLA-Moleküle konnten diese amplifiziert werden. In nahezu allen Transfektanten konnte eine Bande in der richtigen Größe detektiert werden.

Spur M: 100bp-DNA-Marker

Spur 1: Amplifikation von HLA-A*0201

Spur 2-4: Amplifikation von HLA-A*02601

Spur 5-7: Amplifikation von HLA-B*0801

Spur 8-10: Amplifikation von HLA-B*3801

Spur 11-13: Amplifikation von HLA-Cw*0701

Spur 14-16: Amplifikation von HLA-Cw*1203

Die jeweils erste Bande der erwarteten PCR-Produkte ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Das Agarosebild Abb. 40 zeigt, dass wir aus nahezu allen HLA-Transfektanten die entsprechende HLA-Sequenz amplifizieren konnten. Dies lässt mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass die Moleküle an der Zelloberfläche exprimiert werden.

7.1.2 Versuch der Aktivierung der TZR-Transfektanten durch HLA-exprimierende TE671-Zellen

Jeweils fünf verschiedene TE671-Klone, die mit den sechs HLA-Konstrukten transfiziert waren, wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgebracht. Diese wurden mit den TZR-transfizierten Maus-Hybridomen 225 (V β 1-V α 11), 435 (V β 1-V α 2.2), 458 (V β 1-V α 20) sowie 1506 (V β 1-V α 23) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände in einen IL-2-ELISA eingesetzt, um eine mögliche Aktivierung der Maus-Hybridome zu detektieren. Als Positivkontrolle wurden HLA-A*02-positive TE671-Zellen zum einen direkt mit dem synthetischen flu-Peptid 58-66 beladen zum anderen mit einem flu-Konstrukt transient

transfiziert und über Nacht mit der JM22-Transfektante inkubiert. Als Negativkontrolle wurden HLA-A*03-positive TE671 mit den Maus-Hybridomen inkubiert, da HLA-A*03 nicht vom Patient PM16488 exprimiert wird. In Abb. 41 ist lediglich die Analyse der Transfektante 435 dargestellt, da alle vier TZR-Transfektanten dasselbe Ergebnis zeigten.

Die Analyse der IL-2-Überstände (Abb.41a) zeigte bei keiner HLA-Transfektante ein erhöhtes Signal im ELISA. Es konnte also keine der vier TZR-Transfektanten durch die präsentierten Peptide der TE671-Zellen aktiviert werden. Die Positivkontrolle mit der JM22-Transfektante zeigt eine eindeutige Aktivierung.

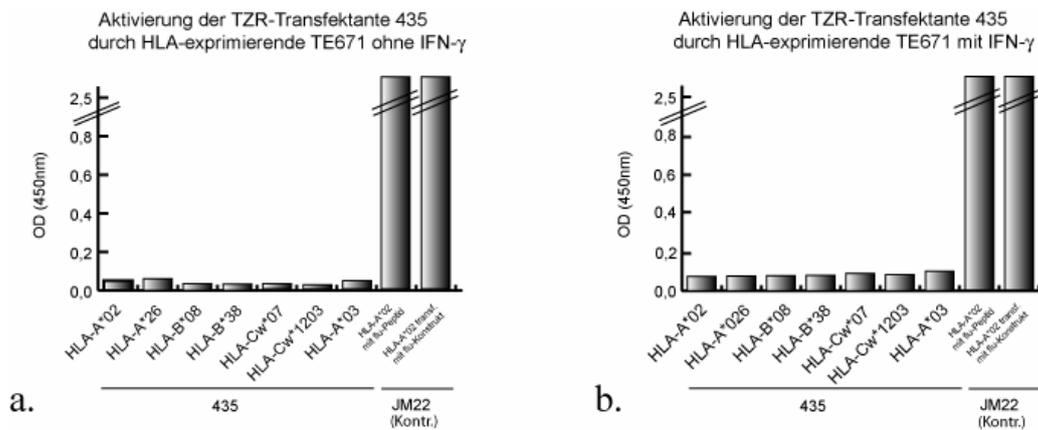


Abb. 41a+b: Aktivierungsassay durch HLA-exprimierende TE671-Transfektanten am Beispiel der TZR-Transfektante 435 ohne und mit IFN- γ -Zugabe (IL-2-ELISA)

Die sechs verschiedenen HLA-Transfektanten der Zelllinie TE671 wurden in eine 96-Lochplatte ausgebracht und 13-16h mit den TZR-Transfektanten ohne und mit IFN- γ -Zugabe inkubiert. Die IL-2-Ausschüttung ins Medium wurde am nächsten Tag mittels IL-2-ELISA gemessen. Beispielhaft ist hier die Aktivierung der Transfektante 435 gezeigt. Als Positivkontrolle dienten die HLA-A*02 exprimierenden TE671-Zellen, beladen mit dem flu-Peptid bzw. transfiziert mit einem flu-Konstrukt, die über Nacht mit der Transfektante JM22 inkubiert wurden.

Auf der x-Achse sind die verschiedenen HLA-Moleküle des Patienten PM16488 gezeigt sowie die beiden Positivkontrollen, die y-Achse zeigt die optische Dichte gemessen bei 450nm.

Da sich die Prozessierung der Proteine durch die Zugabe von Interferon γ in der Zelle durch Veränderung der Proteasomenaktivität ändert (Kuckelkorn et al., 2002; Akiyama et al., 1994) und somit andere Peptide durch die MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden, wiederholten wir den Versuch in Anwesenheit von 5ng/ml Interferon γ . Die Auswertung des IL-2-ELISAs zeigt wiederum keine Aktivierung einer der vier TZR-Transfektanten (Abb. 41b).

7.2 Versuch der Aktivierung der TZR-Transfektanten durch ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen der autologen EBV-B-Zellen des Patienten PM16488

Anschließend untersuchten wir die Präsentation endogener Peptide der PM16488 spezifischen autologen EBV-B-Zellen. Handelt es sich bei dem gesuchten AG um ein Peptid eines ubiquitär exprimierten Proteins der autologen EBV-B-Zellen, sollte dies auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die EBV-B-Zellen wurden aus den B-Zellen des Patienten generiert und exprimieren somit alle patientenspezifischen HLA-Moleküle auf der Oberfläche in der richtigen Gewichtung. Außerdem weisen die exprimierten Proteine alle eventuell vorhandenen patientenspezifischen Mutationen auf (SNPs). Durch die Co-Kultivierung der EBV-B-Zellen mit den TZR-transfizierten Maus-Hybridomzellen konnten wir untersuchen, ob ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen möglicherweise eine Aktivierung der Maus-Hybridome hervorruft. Da die EBV-B-Zellen des Patienten PM16488 das HLA-A*02-Molekül exprimieren, konnten wir diese Zellen wie im vorherigen Versuch beschrieben als APZ für die Positivkontrolle JM22 mit flu 58-66 verwenden. Wir führten den Versuch sowohl mit als auch ohne Interferon γ durch.

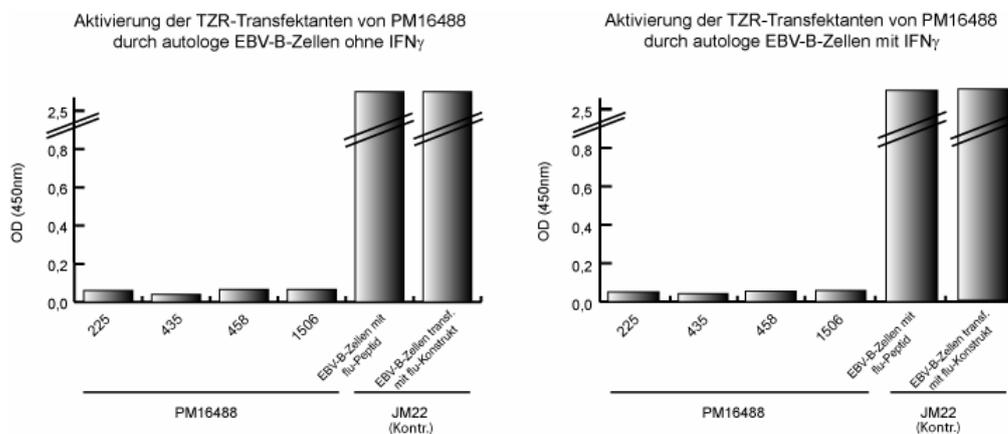


Abb. 42: Aktivierungsassay durch autologe EBV-B-Zellen mit bzw. ohne IFN γ -Induktion (IL-2-ELISA)

Die mit EBV immortalisierten B-Zellen des Patienten PM16488 wurden in eine 96-Lochplatte ausgebracht und 13-16h mit den vier verschiedenen TZR-Transfektanten inkubiert. Die IL-2-Ausschüttung ins Medium wurde am nächsten Tag mittels IL-2-ELISA gemessen. Der Versuch wurde in An- bzw. Abwesenheit von 5ng/ml IFN γ durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die EBV-B-Zellen (HLA-A*02-positiv), beladen mit dem flu-Peptid bzw. transfiziert mit einem flu-Konstrukt über Nacht mit der Transfektante JM22 inkubiert. Auf der X-Achse sind die verschiedenen HLA-Moleküle des Patienten PM16488 gezeigt sowie die beiden Positivkontrollen, die Y-Achse zeigt die optische Dichte gemessen bei 450nm.

Im Gegensatz zur Positivkontrolle mit der JM22-Transfektante, zeigen die vier TZR-Transfektanten keine Aktivierung (Abb. 42).

8. Versuch der Identifizierung eines möglichen Antigens durch Positional Scanning-Combinatorial Peptid Libraries (PS-CPL)

Die Versuche aus Abschnitt 7 zeigten, dass es sich wahrscheinlich weder um ein muskelspezifisches Autoantigen noch um ein ubiquitär exprimiertes Selbstantigen handelt. Wir setzten die Suche mittels Positional Scanning-Combinatorial Peptid Libraries (PS-CPL) fort. Mit diesem Verfahren ist es möglich ein Peptidmotiv zu identifizieren, welches für eine TZR-Aktivierung verantwortlich sein könnte. Nach der Detektion eines solchen Peptidmotivs können dann Kandidatenpeptide synthetisiert und auf ihre Aktivierungsfähigkeit getestet werden. Die hier verwendete Library bestand aus 180 synthetisch hergestellten Peptidmischen. Jedes Peptid setzte sich aus neun Positionen zusammen. Eine der neun Positionen entspricht einer definierten Aminosäure, alle anderen Positionen sind ein Gemisch aus allen 20 möglichen Aminosäuren. Das Prinzip der PS-CPL ist im Methodenteil (II.4.9) genauer erläutert.

In der Literatur gibt es einige Beispiele dafür, dass bei der Analyse eines TZR mit einer bekannten Spezifität in den PS-CPL-Versuchen nicht unbedingt auch das Peptid gefunden wird.

8.1 PS-CPL-Versuch mit den TZR JM22 transfizierten Maus-Hybridomzellen

Da die TZR-Transfektante JM22 in der Literatur gut untersucht ist und auch die Aminosäuresequenz des flu-Peptids 58-66 (GILGFVFTL) bekannt ist, testeten wir die PS-CPL zunächst anhand dieses Modells.

Hierfür wurden die HLA-A*02-positiven LTK-Zellen als APZ verwendet und am Vortag ausgebracht. Am folgenden Tag wurden die Peptidmische der PS-CPL für 6h zugegeben und über Nacht zusammen mit der JM22-Transfektante co-kultiviert. Der Überstand wurde am nächsten Tag in den IL-2-ELISA eingesetzt.

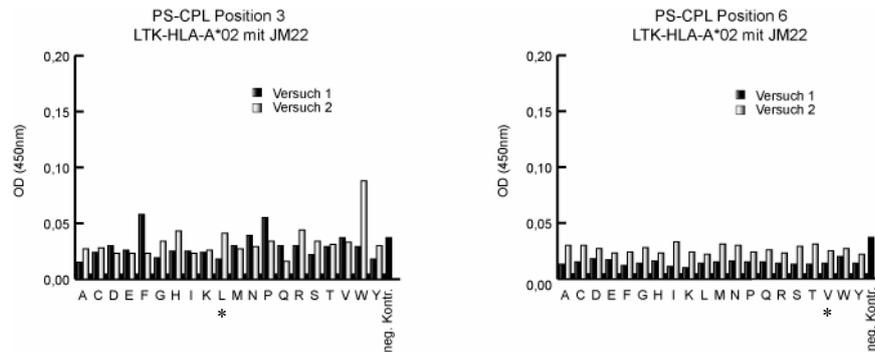


Abb. 43: Position 3 und 6 des PS-CPL-Assays mit der Transfektante JM22 (IL-2-ELISA)

Die beiden Diagramme zeigen beispielhaft zwei Positionen (Position 3 und 6) des PS-CPL-Experiments mit HLA-A*02-positiven LTK-Zellen als APZ und den mit dem TZR JM22 transfizierten Maus-Hybridomzellen. Die APZ wurden am Tag zuvor ausgebracht und am nächsten Tag 6h mit den Peptidmixinen inkubiert. Über Nacht wurde die Transfektante JM22 zugegeben und am folgenden Tag der IL-2-Gehalt im Überstand mittels IL-2-ELISA gemessen. Die x-Achse zeigt die 20 verschiedenen AS, die y-Achse zeigt die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm. Die mit einem Stern markierte AS entspricht der im flu-Peptid 58-66 an dieser Position vorliegenden AS.

Abb. 43 zeigt die Auswertung des IL-2-ELISAs der beiden PS-CPL-Versuche mit der JM22-Transfektante. Es sind nicht alle Positionen dargestellt, sondern lediglich zwei charakteristische Positionen herausgegriffen (Position 3 und 6). Die x-Achse zeigt die AS, die an der entsprechenden Position definiert ist, die y-Achse die optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 450nm. Die mit einem Stern markierte AS entspricht der im flu-Peptid 58-66 an dieser Position vorliegenden AS.

Die Auswertung der verschiedenen Library-Positionen zeigt in den meisten Positionen kein Signal (vgl. Position 6). Andere Positionen weisen zwar in einigen Aminosäuren ein erhöhtes Signal auf, welches sich jedoch in der Wiederholung des Experiments nicht reproduzieren lässt (vgl. Position 3).

8.2 PS-CPL-Versuch mit den TZR 435 transfizierten Maus-Hybridomzellen

Der Klon 435 (V β 1-V α 2.2) ist von besonderem Interesse, da er im Patienten PM16488 expandiert ist. Deshalb führten wir die PS-CPL-Experimente zunächst mit diesem Klon durch. Da die HLA-Restriktion im Gegensatz zum flu-Peptid 58-66 nicht bekannt war, verwendeten wir für die Library-Experimente autologe EBV-B-Zellen des Patienten PM16488. Diese Zellen exprimieren wie zuvor bereits erwähnt alle patientenspezifischen HLA-Moleküle auf ihrer Oberfläche.

Der PS-CPL-Versuch wurde wie in II.4.9 beschrieben durchgeführt.

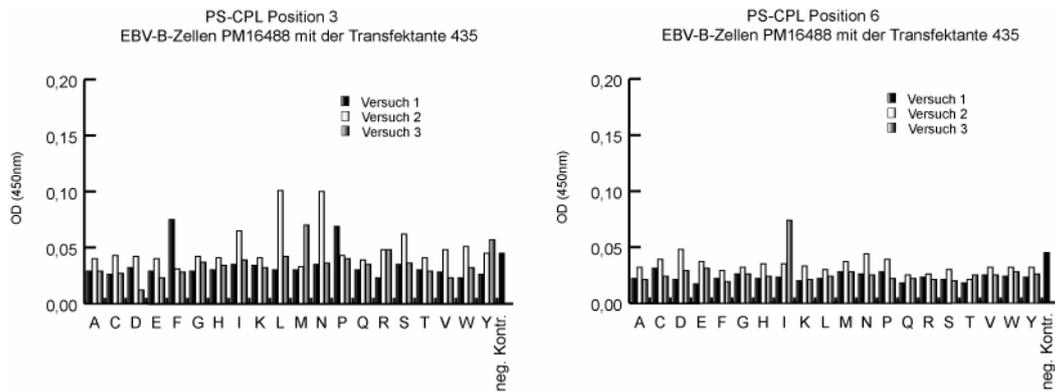


Abb. 44: Position 3 und 6 des PS-CPL-Assays mit der Transfektante 435 (IL-2-ELISA)

Die beiden Diagramme zeigen beispielhaft drei Positionen (Position 3 und 6) des PS-CPL-Experiments mit autologen EBV-B-Zellen als APZ und den mit dem TZR 435 transfizierten Maus-Hybridomzellen des Patienten PM16488. Die APZ wurden ausgebracht und 6h mit den Peptidmischen inkubiert. Über Nacht wurde die Transfektante 435 zugegeben und am folgenden Tag der IL-2-Gehalt im Überstand mittels IL-2-ELISA gemessen. Die x-Achse zeigt die 20 verschiedenen AS, die y-Achse zeigt die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm.

Auch hier sind wiederum nur zwei charakteristische Positionen (Position 3 und 6; Abb. 44) dargestellt, welche ein ähnliches Ergebnis zeigen wie die Experimente mit dem Klon JM22. Das IL-2-Sekretionsmuster der Position 3 z.B. ist in allen drei Versuchen unterschiedlich. Die erhöhten Signale treten jeweils in anderen Aminosäuren auf. Position 6 weist in zwei der drei Versuche keine IL-2-Sekretion auf. Lediglich im letzten Versuch tritt ein erhöhtes Signal in der Aminosäure Isoleucin auf.

Diese mangelnde Reproduzierbarkeit, welche bereits bei den Versuchen mit dem Klon JM22 auftrat, liegt vermutlich an der zu geringen Affinität sowie zu geringen Degeneration des TZR-Peptid/MHC-Komplexes. Ist die Aktivierung der TZR-Transfektante nicht stark genug, kann dieses Signal im IL-2-ELISA nicht detektiert werden. Durch die geringe Signalintensität können ebenfalls leicht falsch positive Signale auftreten.

8.3 Antigensuche mittels modifizierter PS-CPL

Oftmals wird ein TZR stärker aktiviert, wenn das Peptid in modifizierter Form vorliegt oder wenn anstatt eines Neunerpeptids ein Zehnerpeptid dargeboten wird. Aus diesem Grund setzten wir Peptide in die Library-Versuche ein, die am C-terminalen Ende amidiert bzw. am N-terminalen Ende acetyliert vorlagen. Außerdem verwendeten wir zusätzlich eine Zehnerpeptid-Library. Von diesen drei Peptid-Libraries standen lediglich Position 6 und 7 zur Verfügung.

Die Auswertung der PS-CPL-Versuche mit den beiden Neunerpeptid-Libraries sowie mit der Zehnerpeptid-Library zeigte kein signifikantes IL-2-Signal in Position 6 bzw. 7 (Ergebnisse nicht gezeigt).

Somit konnten wir auch mit Hilfe der modifizierten Libraries keine Aussage über ein eventuelles Peptidmotiv für den TZR der Transfektante 435 treffen. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Affinität zwischen dem TZR und dem Peptid/MHC-Komplex wahrscheinlich zu gering bzw. die Degeneration des TZR nicht groß genug ist.

IV. Diskussion

Der Hintergrund dieser Arbeit ist die Frage, weshalb die Zellen des Immunsystems bei Patienten mit Myositis, Multipler Sklerose oder anderen Autoimmunerkrankungen in den Muskel, das Gehirn oder in andere Zielorgane einwandern und welches Antigen sie dort erkennen. Ein Schritt zur Beantwortung dieser Frage war, die gewebsinvasiven potentiell autoaggressive T-Lymphozyten aus dem Zielgewebe durch Lasermikrodissektion zu isolieren und mit einer hierfür entwickelten Einzelzell-PCR $\alpha\beta$ -TZR-Paare zu identifizieren. Im nächsten Schritt wurden die so erhaltenen TZR in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta^-$ „wieder zum Leben erweckt“ (Blank et al., 1993) und für erste Versuche zur Antigensuche eingesetzt.

Unterscheidung zwischen autoreaktiven T-Lymphozyten und bystander-Zellen

Bevor wir beginnen konnten, gezielt Zellen aus Gewebe zu isolieren und zu analysieren, mussten wir zunächst herausfinden, welche T-Lymphozyten für die Analyse interessant sind. Hierfür ist es nötig, zwischen autoaggressiven T-Zellen und so genannten bystander-Zellen unterscheiden zu können. Man nimmt an, dass die erste Welle der Invasion aus autoantigen spezifischen T-Zellen besteht, die im Zielgewebe expandieren. Anschließend wandern jedoch vermehrt irrelevante bystander-Zellen ein, angelockt durch Cytokine und Chemokine (zusammengefasst in Dornmair et al., 2003). Da die Diagnose der Krankheit und somit die Entnahme der Biopsie meist längere Zeit nach Ausbruch der Krankheit erfolgt, sind sowohl Effektor-T-Zellen sowie bystander-Zellen in der Biopsie enthalten. Aus diesem Grund müssen die isolierten T-Zellen zwei Kriterien erfüllen. Zum einen muss die TZR- β -Kette der Zelle klonal expandiert sein, zum anderen muss die Zelle im engen Kontakt mit der Zielzelle stehen. Die klonale Expansion einer β -Kette detektierten wir mittels CDR3-Spektratyping-Analyse (zusammengefasst in Pannetier et al., 1995). Das zweite Kriterium, die Lage der Zelle im Gewebe, ist bei einer Muskelbiopsie eines Myositispatienten sehr aussagekräftig. Bei der Myositis werden die Muskelfasern durch CD8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten zerstört, welche die Muskelfaser kontaktieren oder sogar invadieren (Mantegazza et al., 1993; Engel und Arahata, 1984; zusammengefasst in Engel und Hohlfeld, 2005). Die Zerstörung der Muskelzelle wird hauptsächlich durch das porenbildende Protein Perforin vermittelt (Goebels et al., 1996). Dieser gerichtete und TZR-abhängige Vorgang ist eine typische immunologische Synapse wie sie üblicherweise zwischen T-Lymphozyten und ihrer Target-Zelle auftritt (Stichcombe et al., 2001; Purbhoo et al., 2004). Da nicht relevante bystander-Zellen meist keinen Kontakt zur Muskelfaser haben, sondern sich im Zellzwischenraum befinden, sind diese so leicht von den cytotoxischen Effektor-T-Zellen zu unterscheiden. Die Detektion der CD8⁺-

T-Zellen erfolgte durch die Färbung mit einem Antikörper gegen die variable Region derjenigen TZR- β -Kette, welche zuvor im CDR3-Spektratyping eine Expansion zeigte.

Sowohl das CDR3-Spektratyping als auch die Färbung mit einem Antikörper ist fast ausschließlich auf die Analyse der TZR- β -Kette beschränkt. Durch die wesentlich höhere genetische Variabilität der TZR- α -Kette ist es bis jetzt nicht möglich, eine Spektratyping-Analyse für die α -Kette durchzuführen, denn den 13 verschiedenen J-Elementen der β -Kette stehen 50 verschiedene J-Elemente der α -Kette gegenüber (Arstila et al., 1999). Auch die Färbung der variablen Region der TZR- α -Kette ist nur eingeschränkt möglich, da lediglich drei AK zu Verfügung stehen: V α 2.3, V α 12 und V α 24 (Janson et al., 1989; DerSimonian et al., 1991; Padovan et al., 1993). Somit ist eine Analyse der V α -Kette durch Färbung mit einem AK auf die aufgeführten drei V-Regionen beschränkt. Da die α -Kette also nicht durch Färbung oder CDR3-Spektratyping detektiert werden kann, muss für die gleichzeitige Identifizierung beider TZR-Ketten die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Einzelzell-RT-PCR-Methode angewandt werden. Da diese sehr anspruchsvoll ist, beschränkten sich bisherige Studien fast ausschließlich auf die Untersuchung des β -Ketten-Repertoires (Babbe et al., 2000; Hofbauer et al., 2003; Roers et al., 1998).

Nur in einigen Ausnahmefällen war eine Identifizierung gepaarter $\alpha\beta$ -Ketten dennoch möglich. Es gelang in Experimenten mit lebenden Zellen, die zuvor mit einem der wenigen erhältlichen α -AK gefärbt wurden oder bei Zellen deren α -Kette bereits bekannt war, $\alpha\beta$ -Pärchen zu detektieren (Hamrouni et al., 2003; Kurokawa et al., 2001). Auch in einzelnen Fällen, in denen eine monoklonale Expansion vorlag, konnten $\alpha\beta$ -TZR-Pärchen identifiziert werden. Hier war es möglich ohne Berücksichtigung der Morphologie das Gewebehomogenisat zu analysieren (Hohlfeld et al., 1991; Pluschke et al., 1992; Wiendl et al., 2002; Dornmair et al., 2004).

Die Abgrenzung zwischen autoaggressiven T-Zellen und irrelevanten bystander-Zellen durch den Kontakt der T-Zelle mit einer Zielzelle, konnte bei der Untersuchung des Hirngewebes des MS-Patienten nicht angewandt werden. Im gefärbten Hirngewebe waren keine eindeutigen durch die T-Lymphozyten angegriffenen Zielstrukturen erkennbar. Hier konnten wir nur das Ergebnis der CDR3-Spektratyping-Analyse als Hinweis auf die Pathogenität der Zelle verwenden.

TZR-Paare der Myositispatienten PM16488 sowie IBM15551

Die CDR3-Spektratyping-Analyse des Polymyositispatienten PM16488 lieferte eine V β 1-J β 1.2-Expansion, die des Patienten IBM15551 eine V β 23-J β 1.1-Expansion. Nach der Färbung der T-Lymphozyten mit den entsprechenden AK gegen die variable Region der TZR- β -Ketten

V β 1 sowie V β 23, isolierten wir die Zellen durch Lasermikrodissektion und analysierten sie durch die Einzelzell-PCR.

In 64 der 1230 analysierten Zellen detektierten wir die in der CDR3-Spektratyping-Analyse expandierte V β 1-J β 1.2-TZR-Kette des Patienten PM16488 (5,2%). In neun Zellen fanden wir eine gepaarte α -Kette (0,7%). Sechs Zellen zeigten die identische V α 2.2-J α 54, die anderen drei Zellen wiesen eine unterschiedliche α -Kette auf (V α 11-J α 31, V α 20-J α 37, V α 23-J α 40). In einer erneuten Analyse der 64 V β 1⁺-Zellen mit klonspezifischen Primern gegen die bereits detektierten vier α -Ketten fanden wir weitere 14 Zellen mit einer V α 2.2-J α 54 (1,9%). Die anderen drei α -Ketten konnten bestätigt, jedoch in keiner weiteren Zelle detektiert werden. Diese Dominanz des TZR V β 1-V α 2.2 ist ein Hinweis auf die pathogene Relevanz dieses T-Zell-Klons. Durch ein unbekanntes AG könnte dieser zur Proliferation angeregt worden sein. Betrachtet man die Aminosäuresequenz der CDR3-Region der vier verschiedenen detektierten α -Ketten, so kann man eine Ähnlichkeit der Aminosäuren erkennen. Es sind meist kleine, hydrophile Aminosäuren. Lediglich die negativ geladene Aminosäure Aspartat in der TZR- α -Kette V α 23-J α 40 bildet eine Ausnahme. Ähnliches konnte an immunisierten Mäusen gezeigt werden, in denen eine TZR- β -Kette mit verschiedenen strukturell ähnlichen α -Ketten kombiniert war (Hamrouni et al., 2003). Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass dasselbe Antigen verschiedene TZR, die zwar aus derselben β -Kette jedoch aus unterschiedlichen α -Ketten aufgebaut sind, aktivieren kann. Dies würde bedeuten, dass dieselbe β -Kette während der T-Zell-Diversifikation mit verschiedenen α -Ketten kombinieren kann.

Durch die Analyse des zweiten Patienten IBM15551 konnten wir zeigen, dass die Methode nicht nur in diesem speziellen Fall, sondern generell funktioniert. Wir detektierten die expandierte TZR- β -Kette V β 23-J β 1.1 in acht der 250 analysierten Zellen (3,2%). In zwei Zellen fanden wir eine gepaarte α -Kette (0,8%), eine V α 4.2-J α 47 sowie eine V α 23.1-J α 39. Da die Gewebeprobe nach Analyse von 250 Zellen bereits aufgebraucht war, mussten wir die Untersuchung des Patienten abbrechen.

Nach der Analyse beider Myositispatienten wurde die Methode auch auf den MS-Patienten FE übertragen. Dieser zeigte in der CDR3-Spektratyping-Analyse sowohl im Blut als auch im Hirngewebe eine V β 1-J β 2.3-Expansion. Die Analyse von 2500 CD8⁺/V β 1⁺-T-Lymphozyten aus dem Blut ergaben 56 Zellen mit der korrekten V β -Sequenz (2,2%). In vier Zellen konnten wir dieselbe V α 7.2-J α 16 detektieren (0,16%). In einer erneuten Blutprobe des Patienten trat die Expansion nicht mehr auf. Dies lag vermutlich an den verabreichten Medikamenten. Aus diesem Grund konnten wir die detektierte α -Kette im Blut nicht bestätigen und untersuchten

nun die Hirnbiopsie. Die Biopsie war jedoch in einem sehr schlechten Zustand. Das Hirngewebe war sehr stark zerklüftet, so dass kein zusammenhängender Gewebeverband mehr zu erkennen war. Dies erschwerte die Detektion gefärbter Zellen. Die ersten 115 CD8⁺/Vβ1⁺-Zellen, die wir mit klonspezifischen Primern gegen die vermutete Vα7-TZR-Kette untersuchten, ergaben 15 Zellen mit der korrekten β-Sequenz (13%), jedoch keine korrespondierende α-Kette. Die nachfolgende Analyse von weiteren 83 CD8⁺/Vβ1⁺-Zellen mit den standardmäßig verwendeten universellen Primer Sets ergab neun Zellen mit der korrekten β-Sequenz (10,8%) jedoch wiederum keine α-Kette.

Die Bewertung der Effizienz der Einzelzell-PCR-Methode

Die Effizienz der Einzelzell-RT-PCR-Methode zwischen 5 und 13% für die β-Kette und 0,7-0,8% für die αβ-Paare, detektiert mit den universellen Primer Sets, liegt im erwarteten Bereich. Wie die Vorversuche in Kapitel III.3.1.1 zeigen, spielt die Färbung für die Effizienz der PCR eine wichtige Rolle. Aus ungefärbten Zellen kann man mit einer wesentlich höheren Ausbeute TZR-αβ-Paare amplifizieren, als aus gefärbten Zellen. Wobei die Färbung mit fluoreszenzmarkierten AK noch ein besseres Ergebnis aufweist als die Färbung mit alkalischer Phosphatase (Verringerung um Faktor 0,16). Ein weiterer Punkt ist der Verlust von Zellen während des Katapultierens. Ein gewisser Prozentsatz katapultierter Zellen verfehlt beim Katapultieren den Deckel des PCR-Reaktionsgefäßes und landet wieder auf dem Gewebeschnitt (Verringerung um Faktor 0,66). Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass durch die Schnittdicke von 10µm im Vergleich zur Zellgröße von 15-20µm die Zelle zwar oftmals an der Schnittoberfläche als gefärbter Bereich auftritt, das darunter liegende Zellfragment jedoch nicht mehr groß genug ist und somit nicht mehr genug RNA zur Amplifikation enthält (Verringerung um Faktor 0,5). Die Effizienz der PCR-Methode wird zusätzlich durch die Verwendung eines Antikörpers herabgesetzt, der allgemein gegen die V-Region einer bestimmten TZR-β-Kette gerichtet ist. Die PCR amplifiziert jedoch lediglich eine ganz bestimmte Vβ-NDN-Jβ-Sequenz. Theoretisch besitzen also nur 1/13 der gefärbten T-Lymphozyten die richtige Kombination und zeigen damit ein Signal in der PCR (Verringerung um Faktor 0,077). Multipliziert man nun die errechneten Faktoren der vier aufgeführten Punkte mit den analysierten Zellen, gelangt man in einen Bereich, der durchaus im Rahmen der tatsächlichen Ergebnisse liegt (z.B. PM16488: 1230 Vβ1⁺-Zellen x 0,16 x 0,66 x 0,5 x 0,077 = 5αβ-Paare).

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Faktoren kommen noch zwei weitere Punkte hinzu, die die Ausbeute drastisch herabsetzen können, die jedoch schwer abzuschätzen sind. Zum einen ist die Qualität der RNA der Biopsie ein entscheidender Punkt. Da das Gewebe ursprünglich

aus diagnostischen Gründen aus dem Patienten entnommen wurde, ist nicht bekannt, wie lange die Biopsie vor dem Einfrieren bei RT lagerte. Je länger die Aufbewahrung bei RT erfolgte, desto größer ist das Risiko einer Degradation der RNA. Leider war es nicht möglich die RNA-Qualität der verwendeten Biopsien zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Versuche zu bestimmen. Mittlerweile steht eine Methode zur Verfügung mit der die Qualität der in der Biopsie enthaltenen RNA gemessen werden kann. Somit kann man zukünftig bei der Auswahl der Biopsie darauf achten, dass die RNA möglichst gut erhalten ist. Der zweite Punkt ist die Anzahl der verwendeten Primer. Auch dies kann das Ergebnis der PCR negativ beeinflussen. Durch die große Anzahl an eingesetzten Oligonukleotiden kann die PCR-Reaktion durch eine eventuelle Primerdimerbildung gestört werden.

Wie die Vorversuche in Kapitel III.3.1.2 zeigen, ist die hier beschriebene Multiplex-PCR in der Lage mit großer Effizienz eine eventuell vorhandene zweite α -Kette zu detektieren. Es wurde jedoch in keiner der untersuchten Zellen eine zweite α -Kette gefunden. Auch die wiederholte Analyse der Zellen mit klonspezifischen Primern gegen die bereits gefundenen α -Ketten ergab keine zweite α -Kette.

Die Analyse der Hirnbiopsie des MS-Patienten FE hat bisher noch keine $\alpha\beta$ -Paarung ergeben. Bei 200 analysierten Zellen ist dies statistisch gesehen durchaus möglich. Problematisch jedoch ist die Tatsache, dass alle bisher sequenzierten α -Banden stets die gleiche Nukleotidsequenz zeigten, nämlich die Intronsequenz unmittelbar vor der konstanten Region der α -Kette. Es könnte nun sein, dass mehrere Primer bevorzugt an diese Region binden und so durch eine starke Amplifikation alle anderen Reaktionen unterdrücken. In diesem Fall wäre es nötig, die entsprechenden Oligonukleotide zu optimieren.

Expression der vier TZR des Patienten PM16488 in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$

Nach der Detektion der TZR- $\alpha\beta$ -Paare beider Myositispatienten, klonierten wir die vier verschiedenen TZR des Patienten PM16488 in einen Expressionsvektor und exprimierten diese in der Maus-Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$. Der Vorteil dieser Zelllinie ist neben dem schnellen Wachstum und der leichten Transfizierbarkeit, dass sie keinen eigenen TZR auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Die Zellen exprimieren also nach der Transfektion mit dem menschlichen TZR keine Hybride. Dies würde die Analyse der Zellen und die Antigensuche erschweren. Obwohl die verwendete Zelllinie eine Maus-Zelllinie ist kann ein menschlicher $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -TZR gemeinsam mit dem Maus-CD3-Komplex an der Oberfläche exprimiert werden (Zumla et al., 1992, Wiendl et al., 2002). Auch die Spezifität des TZR bleibt unter murinem Hintergrund vollständig erhalten (zusammengefasst in Dornmair et al., 2003). Dass eine Transfektion und Expression von TZR- α - und β -Ketten in murinen T-Zellen ebenfalls

möglich ist, beschrieb Kessels et al. 2001. Jedoch tritt auch hier die Möglichkeit einer TZR-Hybrid-Expression mit unbekannter Spezifität auf. Desweiteren wachsen T-Zellen langsam und können schlecht transfiziert werden. Der Vorteil solcher Zellen ist der Aktivierungsnachweis über Cytotoxizitätsmessung, der Aktivierungsnachweis der Maus-Hybridomzellen ist nur über die weniger sensitive Interleukin-2-Messung möglich.

Antigensuche

Nach der Identifizierung der TZR-Pärchen aus den verschiedenen Patienten und der Expression der vier TZR des Patienten PM16488 in der Hybridomzelllinie 58 $\alpha\beta$ führten wir erste Versuche zur Detektion eines möglichen Antigens durch.

Um zu untersuchen, ob das gesuchte Peptid möglicherweise ein muskelspezifisches Peptid ist, wurden die TZR-Transfektanten mit der menschlichen Rhabdomyosarkom-Tumor Zelllinie TE671 kokultiviert. Ein Nachteil dieser Zelllinie ist, dass sie keine patientenspezifischen HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. Wir mussten daher alle HLA-Moleküle des Patienten PM16488 zunächst einzeln in die Zelllinie transfizieren. Die TZR-Transfektanten konnten jedoch durch die präsentierten Peptide der Muskelzelllinie nicht aktiviert werden. Durch die Zugabe von Interferon γ sollten die an der Oberfläche präsentierten Peptide variiert werden. Das Cytokin Interferon γ beeinflusst die Expression Interferon γ -induzierbarer Immunoproteasomuntereinheiten wie z.B. LMP2 und LMP7 sowie des PA28-Aktivators des 20S Proteasoms (Boes et al., 1994; Gaczynska et al., 1994; Ahn et al.; 1995), nötig für die Ausbildung von Immunoproteasomen. Die durch das Immunoproteasom gebildeten Peptide weisen vorzugsweise hydrophobe oder basische carboxyterminale Enden auf (Toes et al., 2001). Die Transfektanten zeigten jedoch auch nach Interferon γ -Inkubation keine Aktivierung. Anschließend untersuchten wir, ob einer der TZR ein ubiquitär exprimiertes Antigen erkennt und durch dieses aktiviert werden kann. Hierfür verwendeten wir autologe EBV-B-Zellen als APZ, d.h. B-Zellen des Patienten PM16488, welche mit EBV immortalisiert wurden. Diese haben den Vorteil, dass sie alle patientenspezifischen HLA-Moleküle in der richtigen Gewichtung auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und die exprimierten Proteine alle eventuell vorhandenen patientenspezifischen Mutationen aufweisen. Die Kokultivierung der EBV-B-Zellen mit den vier TZR-Transfektanten zeigte jedoch sowohl mit als auch ohne Interferon- γ keine messbare Aktivierung. Wir können jedoch nicht völlig ausschließen, dass das gesuchte Peptid ein ubiquitär exprimiertes Autoantigen oder ein muskelspezifisches Antigen ist. Da alle Gene in der Zelle unter der Kontrolle verschieden starker Promotoren stehen, werden Gene unterschiedlich stark exprimiert. Stünde das hier gesuchte Antigen unter der Kontrolle eines schwachen Promotors, wäre die Expression zu schwach, um eine ausreichende Menge Peptid

durch das entsprechende HLA-Molekül zu präsentieren und somit die TZR-Transfektanten zu aktivieren. Proteine werden in unterschiedlichen Zelltypen auf verschiedene Weise prozessiert und durch das Proteasom in unterschiedliche Peptidfragmente zerlegt. Dasselbe Protein könnte in den verwendeten TE671-Zellen in andere Peptide zerlegt und präsentiert werden als in den Muskelzellen des Patienten (zusammengefasst in van den Eynde und Morel, 2001). Außerdem könnten bei den TE671-Zellen patientenspezifische Mutationen, so genannte SNPs, die Detektion des Antigens behindern (Brookes, 1999). Hätte der hier untersuchte Patient einen solchen Polymorphismus, welcher in den verwendeten Modellzelllinien nicht auftritt, könnte das gesuchte Peptid nicht von den TZR-Transfektanten erkannt werden.

Da wir weder mit Hilfe der patientenspezifischen EBV-B-Zellen noch mit Hilfe der TE671-Zellen ein Antigen detektieren konnten, verwendeten wir für die weitere Antigensuche verschiedene Positional Scanning-Combinatorial Peptide Libraries (PS-CPL). Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, ein Peptidmotiv zu detektieren, welches den TZR aktiviert. Ausgehend vom erhaltenen Peptidmotiv werden anschließend Kandidatenpeptide synthetisiert und diese auf ihre Aktivierungsfähigkeit getestet, um ein definiertes Peptid zu erhalten. Da wir den TZR V β 1-V α 2.2-Klon (435) 20mal im Patienten PM16488 fanden und dieser somit am interessantesten erschien, führten wir die PS-CPL-Versuche zunächst nur mit dieser TZR-Transfektante sowie mit dem Modell-TZR JM22 durch. Die Experimente mit dem TZR V β 1-V α 2.2 ergaben jedoch kein eindeutiges Peptidmotiv. Zum einen waren die erhaltenen Signale des IL-2-ELISAs sehr schwach, zum anderen waren sie in darauf folgenden Versuchen oftmals nicht reproduzierbar oder sogar widersprüchlich. Um möglicherweise doch noch ein Peptidmotiv zu erhalten, wurden die Versuche in Kollaboration mit dem Labor von Darcy Wilson, San Diego, USA, nochmals wiederholt. Die Methode der PS-CPL wurde in dieser Gruppe entwickelt und ist deshalb dort sehr gut etabliert. Doch auch die Gruppe von D. Wilson konnte durch wiederholte Experimente kein eindeutiges Peptidmotiv detektieren. Der Grund liegt wahrscheinlich an der zu geringen Affinität und der fehlenden Degeneration des untersuchten TZR (persönliche Mitteilung von D. Wilson).

Die PS-CPL-Experimente mit dem Modell-TZR JM22 (V β 17-V α 10), der das Influenza A Virus Matrix Peptid flu 58-66 erkennt (Lehner et al., 1995, Moss et al., 1991), lieferten ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die Auswertung der Versuche zeigte keine IL-2-Signale entsprechend der Aminosäuresequenz des flu-Peptids GILGFVFTL bzw. Signale in homologen Aminosäuren. Zudem waren die Signale wie auch beim TZR V β 1-V α 2.2 (435) des Patienten PM16488 sehr niedrig und überwiegend nicht reproduzierbar, was die Auswertung der Daten zusätzlich erschwerte.

Ein Grund für das negative Ergebnis der Untersuchung beider T-Zell-Rezeptoren könnte die zu geringe Sensitivität der verwendeten Analysemethode sein. Die Sensitivität des IL-2-ELISAs liegt bei etwa 2pg IL-2, was nur gering über dem erwarteten Signal der TZR-Transfektante liegt. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis erschwert eine eindeutige Auswertung, da schwache Signale nicht von Hintergrundsignalen unterschieden werden können.

Weitere Gründe für das negative Ergebnis könnten auch die fehlende Affinität zwischen TZR und MHC/Peptid-Komplex sowie die zu geringe Degeneration des TZR sein. Degeneration bedeutet, dass ein bestimmter TZR nicht nur durch ein bestimmtes Peptid, sondern durch viele verschiedene Peptide aktiviert werden kann (zusammengefasst in Wilson et al., 2004). Ist die Degeneration zu gering, enthält der jeweilige Peptidmix der PS-CPL zu wenige Peptide, die in der Lage sind, die TZR-Transfektante zu aktivieren und somit ein ausreichend hohes IL-2-Signal zu erreichen.

Einige Beispiele aus der Literatur zeigen, dass PS-CPL-Versuche oftmals nicht das native Peptid, sondern ein anderes stärker aktivierendes Peptid detektieren (Hernández et al., 2004; Zhao et al., 2001).

Nachfolgende Abbildung 45 zeigt eine Zusammenfassung der PS-CPL-Versuche von Hernández et al. mit einem bekannten Peptid p572 der menschlichen Telomerase Reversen Transkriptase. In vier aufeinander folgenden Versuchen konnte die native AS nur in drei von neun Positionen detektiert werden (Position 3 = F, Phenylalanin; Position 6 = R, Arginin; Position 9 = V, Valin). Außerdem sieht man, dass die korrekte AS nicht in allen vier der vier durchgeführten Experimente erscheint, sondern bei zwei AS lediglich in zwei bzw. drei Versuchen auftrat.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
4x	Y	H	M			<u>R</u>	R	Y	
3x	L	RT	DP	KM	G	P	Y	R	<u>VP</u>
2x	T	S	<u>EY</u>	Y	AT	SH	SM	K	EF
No peptides	3	4	5	3	3	4	4	3	4
Native seq.	R	L	F	F	Y	R	K	S	V
			↑			↑			↑

Abb. 45:
Häufigkeit
der aktivsten
Library-Mixe
(aus
Hernández et
al., 2004)

Aus diesem Grund verwendet man die Methode der PS-CPL oftmals nicht nur dazu, das native Peptid eines TZR zu finden, sondern Peptid-Analoga von TZR-Klonen zu identifizieren, deren Antigen bereits bekannt ist. Die detektierten Peptide können dann zur Vaccinierung gegen Infektionen oder auch zur Tumorbehandlung eingesetzt werden (zusammengefasst in Wiesmüller et al., 2001).

Hemmer et al. (1999) zeigt jedoch am Beispiel der Lyme disease, dass die Methode für einige TZR durchaus zum Erfolg führen kann.

Abschließend kann man sagen, dass die Methode der PS-CPL für unseren TZR in der durchgeführten Art und Weise nicht zu einem aussagekräftigen Ergebnis geführt hat. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die schwachen Signale auf die zu geringe Degeneriertheit der untersuchten TZR oder auf die zu geringe Sensitivität der Analysemethode zurückzuführen sind.

Ausblick

Wir konnten an zwei Beispielen zeigen, dass die Identifikation und Expression gepaarter TZR α - und β -Ketten pathogener T-Zellen aus Muskelbiopsien von Myositispatienten möglich war. Im nächsten Schritt sollte dies auch in dem bereits beschriebenen MS-Patienten FE erreicht werden. Außerdem könnten weitere Gewebeproben von MS-Patienten analysiert werden. Da es schwierig ist, Biopsiematerial von MS-Patienten zu bekommen, kann man auf Autopsiematerial zurückgreifen, das vor der Analyse auf seine Qualität getestet wurde. Die Methode ist generell für die Analyse aller T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen sowie tumorinfiltrierenden T-Zellen anwendbar. Gelingt es, das AG eines detektierten TZR zu identifizieren, könnte man möglicherweise Rückschlüsse auf die Krankheitsursache ziehen und effektivere Therapieansätze ermöglichen.

Wie bereits beschrieben erwies sich die Sensitivität des IL-2-ELISAs bei den ersten Versuchen ein AG zu finden als zu gering. Aus diesem Grund ist es nötig die Analysemethode zu optimieren. Es sollten Konstrukte kloniert werden, bestehend aus einem Reporter-Gen für GFP bzw. Luciferase, die unter der Kontrolle des NFAT-Promotors stehen (Durand et al., 1988; Verweij et al., 1990; Aarnoudse et al, 2002). NFAT steht für nuclear factor of activated T cells und spielt eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung. Nach einer Aktivierung der Zelle kann die Expression des Reportergens durch Messung der Grünfluoreszenz im Falle des GFP oder der Lumineszenz-Messung im Falle der Luciferase sichtbar gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von LacZ als Reportergen (Sanderson und Shastri, 1994).

Als Alternative zur hier beschriebenen Peptid-Library soll eine cDNA-Library zur Antigensuche angewandt werden. Hierzu wird eine normalisierte Muskellibrary (Invitrogen) durch Rekombination in einen Zielvektor eingebracht und Stocks von jeweils 20 unterschiedlichen cDNA-Fragmenten hergestellt. Diese werden dann transient in APZ transfiziert, die das entsprechende HLA-Molekül exprimieren. Nach der Detektion eines positiven Stocks kann dieser so verdünnt werden, dass nur noch ein Konstrukt pro Stock

vorliegt. Die Probe, die nach erneuter Transfektion eine Aktivierung der TZR-Transfektanten zeigt, wird anschließend sequenziert und analysiert (van den Eynde et al., 1995; Gaugler et al., 1996; Wong et al, 1999).

V. Literaturverzeichnis

- Aarnoudse, C.A., M. Kruse, R. Konopitzky, N. Brouwenstijn, and P.I. Schrier. (2002). TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning. *Int J Cancer* 99:7-13.
- Ahn, J.Y., N. Tanahashi, K. Akiyama, H. Hisamatsu, C. Noda, K. Tanaka, C.H. Chung, N. Shibmara, P.J. Willy, J.D. Mott, and et al. (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366:37-42.
- Akiyama, K., S. Kagawa, T. Tamura, N. Shimbara, M. Takashina, P. Kristensen, K.B. Hendil, K. Tanaka, and A. Ichihara. (1994). Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett* 343:85-88.
- Arahata, K., and A.G. Engel. (1984). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann Neurol* 16:193-208.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455-500.
- Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286:958-961.
- Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. (2000). Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science* 288:1135.
- Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid, and K. Rajewsky. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393-404.
- Babbitt, B.P., P.M. Allen, G. Matsueda, E. Haber, and E.R. Unanue. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317:359-361.
- Bach, J.F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15:516-542.
- Baker, F.J., M. Lee, Y.H. Chien, and M.M. Davis. (2002). Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9374-9379.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- Blank, U., B. Boitel, D. Mege, M. Ermonval, and O. Acuto. (1993). Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *Eur J Immunol* 23:3057-3065.
- Blumberg, R.S., B. Alarcon, J. Sancho, F.V. McDermott, P. Lopez, J. Breitmeyer, and C. Terhorst. (1990). Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J Biol Chem* 265:14036-14043.

- Boes, B., H. Hengel, T. Ruppert, G. Multhaup, U.H. Koszinowski, and P.M. Kloetzel. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179:901-909.
- Boniface, J.J., Z. Reich, D.S. Lyons, and M.M. Davis. (1999). Thermodynamics of T cell receptor binding to peptide-MHC: evidence for a general mechanism of molecular scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11446-11451.
- Brenner, M.B., J. McLean, D.P. Dialynas, J.L. Strominger, J.A. Smith, F.L. Owen, J.G. Seidman, S. Ip, F. Rosen, and M.S. Krangel. (1986). Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322:145-149.
- Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
- Choi, Y.W., B. Kotzin, L. Herron, J. Callahan, P. Marrack, and J. Kappler. (1989). Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8941-8945.
- Chothia, C., D.R. Boswell, and A.M. Lesk. (1988). The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *Embo J* 7:3745-3755.
- Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman, and C. Terhorst. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6:629-662.
- Dalakas, M.C. (2002). Understanding the immunopathogenesis of inclusion-body myositis: present and future prospects. *Rev Neurol (Paris)* 158:948-958.
- Davis, M.M., and P.J. Bjorkman. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402.
- Davis, M.M., J.J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y. Chien. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:523-544.
- DerSimonian, H., H. Band, and M.B. Brenner. (1991). Increased frequency of T cell receptor V alpha 12.1 expression on CD8+ T cells: evidence that V alpha participates in shaping the peripheral T cell repertoire. *J Exp Med* 174:639-648.
- Dornmair, K., N. Goebels, H.U. Weltzien, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. (2003). T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors. *Am J Pathol* 163:1215-1226.
- Dornmair, K., C.K. Schneider, J. Malotka, G. Dechant, H. Wiendl, and R. Hohlfeld. (2004). Antigen recognition properties of a Vgamma1.3Vdelta2-T-cell receptor from a rare variant of polymyositis. *J Neuroimmunol* 152:168-175.
- Durand, D.B., J.P. Shaw, M.R. Bush, R.E. Repogle, R. Belagaje, and G.R. Crabtree. (1988). Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer. *Mol Cell Biol* 8:1715-1724.
- Ebers, G.C., A.D. Sadovnick, and N.J. Risch. (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150-151.
- Ebers, G.C., and D.A. Dyment. (1998). Genetics of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 18:295-299.
- Engel, A.G., and K. Arahata. (1984). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. II: Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. *Ann Neurol* 16:209-215.
- Engel, A.G., Hohlfeld, R., Banker, B.Q. (1994). The polymyositis and dermatomyositis syndromes. New York. 1335-1383 pp.

- Engel, A.G., Hohlfeld, R. (2005). *Myology: Basic and Clinical*. New York. 1321-1366 pp.
- van den Eynde, B., O. Peeters, O. De Backer, B. Gaugler, S. Lucas, and T. Boon. (1995). A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 182:689-698.
- van den Eynde, B.J., and S. Morel. (2001). Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 13:147-153.
- Fremont, D.H., M. Matsumura, E.A. Stura, P.A. Peterson, and I.A. Wilson. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 257:919-927.
- Frohman, M.A., M.K. Dush, and G.R. Martin. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8998-9002.
- Fugmann, S.D., A.I. Lee, P.E. Shockett, I.J. Villey, and D.G. Schatz. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18:495-527.
- Gaczynska, M., K.L. Rock, T. Spies, and A.L. Goldberg. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9213-9217.
- Garboczi, D.N., P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison, and D.C. 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, R.L. Stanfield, A. Brunmark, M.R. Jackson, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274:209-219.
- Garcia, K.C., M. Degano, L.R. Pease, M. Huang, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. (1998). Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279:1166-1172.
- Garcia, K.C., L. Teyton, and I.A. Wilson. (1999). Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17:369-397.
- Garcia, K.C., and E.J. Adams. (2005). How the T cell receptor sees antigen--a structural view. *Cell* 122:333-336.
- Gaugler, B., N. Brouwenstijn, V. Vantomme, J.P. Szikora, C.W. Van der Spek, J.J. Patard, T. Boon, P. Schrier, and B.J. Van den Eynde. (1996). A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44:323-330.
- Gauss, G.H., and M.R. Lieber. (1996). Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 16:258-269.
- Gautam, A.M., C.I. Pearson, D.E. Smilek, L. Steinman, and H.O. McDevitt. (1992). A polyalanine peptide with only five native myelin basic protein residues induces autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 176:605-609.
- Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71:101-132.
- Goebels, N., D. Michaelis, M. Engelhardt, S. Huber, A. Bender, D. Pongratz, M.A. Johnson, H. Wekerle, J. Tschopp, D. Jenne, and R. Hohlfeld. (1996). Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J Clin Invest* 97:2905-2910.
- Gorer, P.A. (1938). The antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol* 47:231-252.

- Hafler, D.A. (2004). Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 113:788-794.
- Hamrouni, A., A. Aublin, P. Guillaume, and J.L. Maryanski. (2003). T cell receptor gene rearrangement lineage analysis reveals clues for the origin of highly restricted antigen-specific repertoires. *J Exp Med* 197:601-614.
- He, X., C.A. Janeway, Jr., M. Levine, E. Robinson, P. Preston-Hurlburt, C. Viret, and K. Bottomly. (2002). Dual receptor T cells extend the immune repertoire for foreign antigens. *Nat Immunol* 3:127-134.
- Hemmer, B., M. Vergelli, C. Pinilla, R. Houghten, and R. Martin. (1998). Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 19:163-168.
- Hemmer, B., B. Gran, Y. Zhao, A. Marques, J. Pascal, A. Tzou, T. Kondo, I. Cortese, B. Bielekova, S.E. Straus, H.F. McFarland, R. Houghten, R. Simon, C. Pinilla, and R. Martin. (1999). Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 5:1375-1382.
- Hernández, J., K. Schoeder, S.E. Blondelle, F.G. Pons, Y.C. Lone, A. Simora, P. Langlade-Demoyen, D.B. Wilson, and M. Zanetti. (2004). Antigenicity and immunogenicity of peptide analogues of a low affinity peptide of the human telomerase reverse transcriptase tumor antigen. *Eur J Immunol* 34:2331-2341.
- Hofbauer, M., S. Wiesener, H. Babbe, A. Roers, H. Wekerle, K. Dornmair, R. Hohlfeld, and N. Goebels. (2003). Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4090-4095.
- Hohlfeld, R., A.G. Engel, K. Ii, and M.C. Harper. (1991). Polymyositis mediated by T lymphocytes that express the gamma/delta receptor. *N Engl J Med* 324:877-881.
- Hohlfeld, R., and A.G. Engel. (1994). The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 15:269-274.
- Housset, D., and B. Malissen. (2003). What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol* 24:429-437.
- Hughes, M.M., M. Yassai, J.R. Sedy, T.D. Wehrly, C.Y. Huang, O. Kanagawa, J. Gorski, and B.P. Sleckman. (2003). T cell receptor CDR3 loop length repertoire is determined primarily by features of the V(D)J recombination reaction. *Eur J Immunol* 33:1568-1575.
- Hülsmeier, M., R.C. Hillig, A. Volz, M. Ruhl, W. Schroder, W. Saenger, A. Ziegler, and B. Uchanska-Ziegler. (2002). HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit subtle structural alterations. *J Biol Chem* 277:47844-47853.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik. (2002). Immunologie.
- Janson, C.H., M.J. Tehrani, H. Mellstedt, and H. Wigzell. (1989). Anti-idiotypic monoclonal antibody to a T-cell chronic lymphatic leukemia. Characterization of the antibody, in vitro effector functions and results of therapy. *Cancer Immunol Immunother* 28:225-232.
- Jores, R., P.M. Alzari, and T. Meo. (1990). Resolution of hypervariable regions in T-cell receptor beta chains by a modified Wu-Kabat index of amino acid diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9138-9142.
- Katayama, C.D., F.J. Eidelman, A. Duncan, F. Hooshmand, and S.M. Hedrick. (1995). Predicted complementarity determining regions of the T cell antigen receptor determine antigen specificity. *Embo J* 14:927-938.
- Kessels, H.W., M.C. Wolkers, M.D. van den Boom, M.A. van der Valk, and T.N. Schumacher. (2001). Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat Immunol* 2:957-961.

- Kinne, R.W., E. Palombo-Kinne, and F. Emmrich. (1997). T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis villains or accomplices? *Biochim Biophys Acta* 1360:109-141.
- Krogsgaard, M., and M.M. Davis. (2005). How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* 6:239-245.
- Kronenberg, M., G. Siu, L.E. Hood, and N. Shastri. (1986). The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 4:529-591.
- Kuckelkorn, U., E.A. Ferreira, I. Drung, U. Liewer, P.M. Kloetzel, and M. Theobald. (2002). The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context. *Eur J Immunol* 32:1368-1375.
- Kurokawa, M., J. Tong, T. Matsui, K. Masuko-Hongo, T. Yabe, K. Nishioka, K. Yamamoto, and T. Kato. (2001). Paired cloning of the T cell receptor alpha and beta genes from a single T cell without the establishment of a T cell clone. *Clin Exp Immunol* 123:340-345.
- Lehner, P.J., E.C. Wang, P.A. Moss, S. Williams, K. Platt, S.M. Friedman, J.I. Bell, and L.K. Borysiewicz. (1995). Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J Exp Med* 181:79-91.
- Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353:321-325.
- Mantegazza, R., F. Andreetta, P. Bernasconi, F. Baggi, J.R. Oksenberg, O. Simoncini, M. Mora, F. Cornelio, and L. Steinman. (1993). Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T lymphocytes in polymyositis. Restricted V alpha/beta rearrangements may indicate antigen-driven selection. *J Clin Invest* 91:2880-2886.
- Margulies, D.H. (1997). Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes: a quantitative basis for mechanistic models. *Curr Opin Immunol* 9:390-395.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 19:395-404.
- Mastaglia, F.L., and B.A. Phillips. (2002). Idiopathic inflammatory myopathies: epidemiology, classification, and diagnostic criteria. *Rheum Dis Clin North Am* 28:723-741.
- McFarlin, D.E., and H.F. McFarland. (1982). Multiple sclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 307:1183-1188.
- Mellman, I., and R.M. Steinman. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
- van der Merwe, P.A., and S.J. Davis. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 21:659-684.
- Meuer, S.C., K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, J.C. Hodgdon, S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz. (1983). Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 157:705-719.
- Moss, P.A., R.J. Moots, W.M. Rosenberg, S.J. Rowland-Jones, H.C. Bodmer, A.J. McMichael, and J.I. Bell. (1991). Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8987-8990.
- Moss, P.A., and J.I. Bell. (1995). Sequence analysis of the human alpha beta T-cell receptor CDR3 region. *Immunogenetics* 42:10-18.

- Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. (1993). Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 262:422-424.
- Pamer, E., and P. Cresswell. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-358.
- Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky. (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176-181.
- Pluschke, G., D. Ruegg, R. Hohlfeld, and A.G. Engel. (1992). Autoaggressive myocytotoxic T lymphocytes expressing an unusual gamma/delta T cell receptor. *J Exp Med* 176:1785-1789.
- Prinz, I., J. Zerrahn, S.H. Kaufmann, and U. Steinhoff. (2002). Promiscuous peptide recognition of an autoreactive CD8(+) T-cell clone is responsible for autoimmune intestinal pathology. *J Autoimmun* 18:281-287.
- Purbhoo, M.A., D.J. Irvine, J.B. Huppa, and M.M. Davis. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 5:524-530.
- Rock, K.L., and A.L. Goldberg. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17:739-779.
- Roers, A., M. Montesinos-Rongen, M.L. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. (1998). Amplification of TCRbeta gene rearrangements from micromanipulated single cells: T cells rosetting around Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease are polyclonal. *Eur J Immunol* 28:2424-2431.
- Rowen, L., B.F. Koop, and L. Hood. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272:1755-1762.
- Rudolph, M.G., J.G. Luz, and I.A. Wilson. (2002). Structural and thermodynamic correlates of T cell signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:121-149.
- Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24:419-466.
- Saito, T., A. Weiss, J. Miller, M.A. Norcross, and R.N. Germain. (1987). Specific antigen-Ia activation of transfected human T cells expressing murine Ti alpha beta-human T3 receptor complexes. *Nature* 325:125-130.
- Samelson, L.E., M.D. Patel, A.M. Weissman, J.B. Harford, and R.D. Klausner. (1986). Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* 46:1083-1090.
- Sanderson, S., and N. Shastri. (1994). LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol* 6:369-376.
- Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and M.S. Schlissel. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 10:359-383.
- Seitz, S., C.K. Schneider, J. Malotka, X. Nong, A.G. Engel, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and K. Dornmair. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12057-12062.
- Skulina, C., S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and N. Goebels. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2428-2433.

- Steinman, L., R. Martin, C. Bernard, P. Conlon, and J.R. Oksenberg. (2002). Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 25:491-505.
- Steinman, L., and S. Zamvil. (2003). Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 3:483-492.
- Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
- Stinchcombe, J.C., G. Bossi, S. Booth, and G.M. Griffiths. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751-761.
- Stinissen, P., J. Raus, and J. Zhang. (1997). Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol* 17:33-75.
- Sospedra, M., and R. Martin. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
- Tahara, H., K. Fujio, Y. Araki, K. Setoguchi, Y. Misaki, T. Kitamura, and K. Yamamoto. (2003). Reconstitution of CD8+ T cells by retroviral transfer of the TCR alpha beta-chain genes isolated from a clonally expanded P815-infiltrating lymphocyte. *J Immunol* 171:2154-2160.
- Tisch, R., and H. McDevitt. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291-297.
- Toes, R.E., A.K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N.P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T.P. Dick, J. Muller, B. Schonfish, C. Schmid, H.J. Fehling, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, and H. Schild. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194:1-12.
- Townsend, A., and H. Bodmer. (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7:601-624.
- Turley, S.J., K. Inaba, W.S. Garrett, M. Ebersold, J. Unternaehrer, R.M. Steinman, and I. Mellman. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288:522-527.
- Uematsu, Y., H. Wege, A. Straus, M. Ott, W. Bannwarth, J. Lanchbury, G. Panayi, and M. Steinmetz. (1991). The T-cell-receptor repertoire in the synovial fluid of a patient with rheumatoid arthritis is polyclonal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8534-8538.
- Verweij, C.L., C. Gidos, and G.R. Crabtree. (1990). Cell type specificity and activation requirements for NFAT-1 (nuclear factor of activated T-cells) transcriptional activity determined by a new method using transgenic mice to assay transcriptional activity of an individual nuclear factor. *J Biol Chem* 265:15788-15795.
- Weiss, A., and J.D. Stobo. (1984). Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med* 160:1284-1299.
- Wekerle, H. (1992). Myelin specific, autoaggressive T cell clones in the normal immune repertoire: their nature and their regulation. *Int Rev Immunol* 9:231-241.
- Wiendl, H., J. Malotka, B. Holzwarth, H.U. Weltzien, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and K. Dornmair. (2002). An autoreactive gamma delta TCR derived from a polymyositis lesion. *J Immunol* 169:515-521.

- Wiesmüller, K.H., B. Fleckenstein, and G. Jung. (2001). Peptide vaccines and peptide libraries. *Biol Chem* 382:571-579.
- Willcox, B.E., G.F. Gao, J.R. Wyer, J.E. Ladbury, J.I. Bell, B.K. Jakobsen, and P.A. van der Merwe. (1999). TCR binding to peptide-MHC stabilizes a flexible recognition interface. *Immunity* 10:357-365.
- Wilson, R.K., E. Lai, P. Concannon, R.K. Barth, and L.E. Hood. (1988). Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol Rev* 101:149-172.
- Wilson, D.B., C. Pinilla, D.H. Wilson, K. Schroder, C. Boggiano, V. Judkowski, J. Kaye, B. Hemmer, R. Martin, and R.A. Houghten. (1999). Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands. *J Immunol* 163:6424-6434.
- Wilson, D.B., D.H. Wilson, K. Schroder, C. Pinilla, S. Blondelle, R.A. Houghten, and K.C. Garcia. (2004). Specificity and degeneracy of T cells. *Mol Immunol* 40:1047-1055.
- Wong, F.S., J. Karttunen, C. Dumont, L. Wen, I. Visintin, I.M. Pilip, N. Shastri, E.G. Pamer, and C.A. Janeway, Jr. (1999). Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* 5:1026-1031.
- Wu, L.C., D.S. Tuot, D.S. Lyons, K.C. Garcia, and M.M. Davis. (2002). Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide MHC. *Nature* 418:552-556.
- Yewdell, J.W., L.C. Anton, and J.R. Bennink. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 157:1823-1826.
- Zhao, Y., B. Gran, C. Pinilla, S. Markovic-Plese, B. Hemmer, A. Tzou, L.W. Whitney, W.E. Biddison, R. Martin, and R. Simon. (2001). Combinatorial peptide libraries and biometric score matrices permit the quantitative analysis of specific and degenerate interactions between clonotypic TCR and MHC peptide ligands. *J Immunol* 167:2130-2141.
- Zumla, A., A. McCormack, A. George, R. Batchelor, and R. Lechler. (1992). Use of a murine T-cell hybridoma expressing human T-cell receptor alpha- and beta-gene products as a tool for the production of human T-cell receptor-specific monoclonal antibodies. *Hum Immunol* 35:141-148.

VI. Anhang

1. Sequenzen der verwendeten TZR α - und β -Ketten

Nachfolgend sind Teile der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TZR α - und β -Ketten aufgeführt.

Grün unterlegt: Teil der V-Region direkt vor dem hypervariablen Bereich

Schwarz unterlegt: hypervariable Region

Rot unterlegt: Anfang der J-Region

PM16488

V β 1-J β 1.2	TGT	GCC	AGC	AGC	GTA	GGG	GGA	CTC	TAT	GGC	TAC	ACC	TTC
	C	A	S	S	V	G	G	L	Y	G	Y	T	F
V α 2.2-J α 54	TGT	GCA	ATG	AGT	CAG	GGA	GCC	CAG	AAG	CTG	GTA	TTT	
	C	A	M	S	Q	G	A	Q	K	L	V	F	
V α 11-J α 31	TGT	GCT	GTG	GGC	TCC	AAT	GCC	AGA	CTC	ATG	TTT		
	C	A	V	G	S	N	A	R	L	M	F		
V α 20-J α 37	TGC	CTT	CTC	TCT	AGC	AAC	ACA	GGC	AAA	CTA	ATC	TTT	
	C	L	L	S	S	N	T	G	K	L	I	F	
V α 23-J α 40	TGT	GCT	GTG	GAC	TCA	GGA	ACC	TAC	AAA	TAC	ATC	TTT	
	C	A	V	D	S	G	T	Y	K	Y	I	F	

IBM15551

V β 23-J β 1.1	TGT	GCC	AGC	AGC	TCC	GAC	AGG	GAG	AAC	ACT	GAA	GCT	TTC
	C	A	S	S	S	D	R	E	N	T	E	A	F
	TTT												
	F												
V α 4.2-J α 47	TGC	ATC	GCC	TCA	GTA	TAT	GGA	AAC	AAA	CTG	GTC	TTT	
	C	I	A	S	V	Y	G	N	K	L	V	F	
V α 23.1-J α 39	TGT	GCT	GTC	CTT	AAT	GCA	GGC	AAC	ATG	CTC	ACC	TTT	
	C	A	V	L	N	A	G	N	M	L	T	F	

FE

V β 1-J β 2.3	TGT	GCC	AGC	AGC	ATT	AGC	GGG	AGG	AAG	GAT	ACG	CAG	TAT
	C	A	S	S	I	S	G	R	K	D	T	Q	Y
	TTT												
	F												

JM22

V β 17-J β 2.7	TGT	GCC	AGT	AGT	TCG	AGG	AGC	TCC	TAC	GAG	CAG	TAC	TTC
	C	A	S	S	S	R	S	S	Y	E	Q	Y	F
V α 10-J α 42	TGT	GCA	GGA	GCG	GGA	AGC	CAA	GGA	AAT	CTC	ATC	TTT	
	C	A	G	A	G	S	Q	G	N	L	I	F	

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<u>Ab</u> bildung
amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APZ	<u>A</u> ntigen- <u>p</u> räsentierende <u>Z</u> elle
AK	Antikörper
AS	<u>A</u> minosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation (Oberflächenantigenomenklatur)
cDNA	komplementäre DNA
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region (<i>complementary determining region</i>)
C-Region	konstante Region (<i>constant region</i>)
Cy3	<u>C</u> ytochrom <u>3</u> Fluoreszenzfarbstoff
D	<u>D</u> iversity
DEPC	<u>D</u> iethylpyrocarbonat
dNTP	2'- <u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
EBV	<u>E</u> bstein- <u>B</u> arr- <u>V</u> irus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
FACS	<u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	<u>F</u> luoreszeini <u>s</u> othiocyant
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
hygro ^R	<u>H</u> ygromycin- <u>R</u> esistenz
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eucocyte <u>A</u> ntigen
IBM	Einschlusskörperchenmyositis (Inclusion <u>b</u> ody <u>m</u> yositis)
IL-2	<u>I</u> nterleukin- <u>2</u>
J	<u>J</u> oining
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium
MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose
NFAT	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor of <u>a</u> ctivated <u>T</u> cells
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
neo ^R	<u>N</u> eomycin- <u>R</u> esistenz
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PM	<u>P</u> oly <u>m</u> yositis
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	<u>R</u> ibonukle <u>a</u> se
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute of rotor</i>)
RPMI	„ <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute“
Taq	hitze stabile Polymerase von <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
tet ^R	<u>T</u> etracyclin- <u>R</u> esistenz
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	<u>T</u> - <u>Z</u> ell- <u>R</u> ezeptor
U	Einheit für die Enzymaktivität (<i>unit</i>)
V-Region	Variable Region (<i>variable region</i>)

Erklärung gemäß §4 Abs. 3 S. 3, 5, 8 der Promotionsordnung für Biologie

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Diese Dissertation hat weder in gleicher oder ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe weder bereits früher akademische Grade erworben noch versucht zu erwerben.

Sabine Seitz

Martinsried, 12.02.2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Dornmair für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die intensive Betreuung und das große Interesse, dass er dieser Arbeit entgegenbrachte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Hohlfeld für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit innerhalb des Max-Planck-Institutes für Neurobiologie in Martinsried.

Bei Herrn Prof. Georg Krohne bedanke ich mich für die Begutachtung und Vertretung der Arbeit seitens der Universität Würzburg.

Bedanken möchte ich mich auch bei Alexander Flügel und Harald Schnürch für die Übernahme der Aufgaben des Doktorandenkomitees.

Mein ganz besonderer Dank gilt Joachim Malotka für seine Unterstützung bei der Bewältigung der großen Datenmengen und für seine Hilfe in allen molekularbiologischen Dingen.

Danken möchte ich auch den Labormädels für ihre Unterstützung. Besonders Ingrid Eiglmeier für die Anfertigung der Gewebeschnitte und der Spekatratypes sowie Martina Sölch für die Hilfe in der Zellkultur.

Angelika Kuhl möchte ich dafür danken, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte und für die kleinen Auszeiten zwischendurch.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Freund Alexander, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Vorname: Sabine
Nachname: Seitz
Geburtsdatum: 11. Januar 1978
Geburtsort: Miltenberg

Schule:

09/1984 – 07/1988 Grundsichule
09/1988 – 06/1997 Johannes-Butzbach-Gymnasium, Miltenberg

Studium:

10/1997 – 10/1999 Grundstudium der allgemeinen Biologie
12.10.1999 Vordiplom Biologie
10/1999 – 03/2003 Hauptstudium mit den Schwerpunkten Zell- und
Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie und Biochemie
06/2002 – 3/2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungs-
biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Georg Krohne
mit dem Thema: Funktionelle Untersuchung einiger
Kernmembranmoleküle von *Drosophila melanogaster*
06.03.2003 Diplom Biologie

Promotion:

08/2003 – heute Promotion am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in
Martinsried, Abteilung Neuroimmunologie in der Arbeitsgruppe
von Dr. rer. nat. Klaus Dornmair
Thema: Identifikation und Charakterisierung von autoreaktiven
humanen T-Zell-Rezeptor Molekülen

Publikationen

Aus der Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg ging hervor:

Wagner, N., Weber, D., Seitz, S. and Krohne, G. (2004). The lamin B receptor of *Drosophila melanogaster*. *JCS* **117**: 2015-2028.

Aus der vorliegenden Dissertation ging hervor:

Seitz, S., C.K. Schneider, J. Malotka, X. Nong, A.G. Engel, H. Wekerle, R. Hohlfeld, and K. Dornmair. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor α - and β -chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:12057-12062.

Kramer, E.R., Aron, L., Ramakers, G.M.J., Seitz, S., Zhuang, X., Beyer, K., Smidt, M.P. and Klein, R.. (2007) Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system; *PLoS Biol* **5** (3):e39