

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

Über den Beitrag von V $\alpha$ - und J $\alpha$ -Segmenten  
des T-Zellrezeptors von CD8 T-Zellen der Ratte bei RT1f-  
spezifischer Alloreaktion und positiver Selektion im Thymus

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

vorgelegt von  
**Angela Deutschländer**  
aus München

Würzburg, November 2001

Referent: Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Koreferent: Professor Dr. med. Ralf Gold

Dekan: Professor Dr. med. Volker ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2002

Die Promovendin ist Ärztin.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	DER $\alpha\beta$ T-ZELLREZEPTOR	2
1.2	ORGANISATION DER T-ZELLREZEPTORGENE DER RATTE	4
1.3	MHC-RESTRIKTION	8
1.4	DIE KOREZEPTOREN CD4 UND CD8	11
1.5	POSITIVE UND NEGATIVE SELEKTION IM THYMUS	12
1.6	DER BEITRAG VON T-ZELLREZEPTORSEGMENTEN ZU ALLOREAKTIVITÄT VON T-ZELLEN UND SELEKTION VON THYMOZYTEN	17
1.7	AUFGABENSTELLUNG	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>29</b>
2.1	PUFFER, MEDIEN UND LÖSUNGEN	29
2.2	STANDARDS UND KITS	32
2.2.1	Kits	32
2.2.2	DNA-Molekulargewichtsmarker	32
2.2.3	Radioaktive Substanzen	32
2.3	GERÄTE	33
2.4	SEROLOGISCHE REAGENZIEN	34
2.5	ENZYME	35
2.6	VEKTOR	35
2.7	BAKTERIEN	36
2.8	PRIMER	36
2.9	VERSUCHSTIERE	38
2.10	SOFTWARE	38
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>39</b>
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	39
3.1.1	Zellisolierung aus Lymphknoten und Milz	39

3.1.1.1	Isolierung von Lymphknotenzellen.....	39
3.1.1.2	Isolierung dendritischer Zellen der Milz .....	39
3.1.1.3	Bestrahlung von Zellen.....	40
3.1.2	Nylonwollfiltration: Trennverfahren zur Anreicherung von T-Zellen ...	40
3.1.3	Magnetic activated cell sorter (MACS <sup>®</sup> ): Immunmagnetisches Trennverfahren zur Depletion von B-Zellen und CD4+ T-Zellen.....	41
3.1.3.1	Immunmagnetische Markierung für den MACS <sup>®</sup> .....	41
3.1.3.2	MACS <sup>®</sup> : magnetisch aktivierter Zellsort.....	42
3.1.4	Lebendzellzahlbestimmung .....	43
3.1.5	Immunfluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer (FACScan).....	43
3.1.5.1	Zellfärbungen für die Durchflußzytometrie .....	43
3.1.5.2	Immunfluoreszenzanalyse (FACScan) .....	44
3.1.6	FACS <sup>®</sup> : Fluoreszenzaktivierter Zellsorter .....	45
3.1.7	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR).....	46
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	47
3.2.1	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	47
3.2.2	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	48
3.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren ...	48
3.2.4	Isolierung zytoplasmatischer RNA .....	49
3.2.5	cDNA-Synthese .....	50
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	51
3.2.7	Proteinase K-Behandlung .....	53
3.2.8	Erzeugung von blunt ends.....	53
3.2.9	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	54
3.2.10	Restriktionsenzymatische DNA-Spaltung .....	54
3.2.11	Ligation .....	55
3.2.12	Transformation.....	56
3.2.13	Hybridisierung .....	57
3.2.13.1	Übertragung von Bakterien-DNA auf Nitrozellulosefilter .....	57
3.2.13.2	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	58
3.2.14	Autoradiographie .....	59
3.2.15	Bakterienanzucht.....	59

3.2.16	Plasmidisolierung.....	59
3.2.16.1	Plasmidisolierung durch alkalische Extraktion (Mini-Prep) .....	59
3.2.16.2	Plasmidisolierung mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Mini-Prep; Qiagen, Hilden) .....	60
3.2.17	Sequenzierung.....	61
3.2.17.1	Sequenzierung mit dem T7 Sequencing™ Kit (Pharmacia); Auftrennung über ein vertikales Sequenzierungsgel .....	61
3.2.17.2	Sequenzierung mit dem ABI PRISM Ready Reaction Kit (Perkin Elmer); Auftrennung im 373 A DNA-Sequenzierer.....	63
3.2.18	Isolierung genomischer DNA .....	64
3.2.19	Semiquantitative PCR-Analyse des V $\beta$ -Repertoires .....	65
3.3	STATISTIK .....	67
3.4	ZUGANGSNUMMERN (EMBL DATENBANK) .....	67
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>68</b>
4.1	ZELLISOLIERUNG .....	68
4.1.1	Effektivität der Nylonwollfiltration zur Anreicherung von T-Zellen .....	68
4.1.2	Anreicherung von CD8 T-Zellen durch Nylonwollfiltration und magnetisch-aktivierten Zellsort .....	69
4.1.3	Isolierung von RT1f-alloreaktiven mAk G177+ peripheren LEW CD8 T-Zellen.....	71
4.2	J $\alpha$ -GEBRAUCH UND CDR3 $\alpha$ -REGIONEN.....	72
4.2.1	PCR-Amplifikation von V $\alpha$ 8+ TCR cDNA .....	72
4.2.2	Klonierung und Sequenzierung.....	73
4.2.3	Spezifität des mAk G177.....	77
4.2.4	Nukleotidsequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen von 50 unabhängigen cDNA-Klonen RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ CD8 LEW T-Zellen .....	77
4.2.5	Erstbeschreibung von zehn TCR J $\alpha$ -Segmenten der LEW Ratte .....	80
4.2.6	Selektiver J $\alpha$ -Gebrauch RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen.....	82
4.2.7	Keimbahnsequenz des 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2.....	84

4.2.8	Komposition der CDR3 $\alpha$ -Region RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen .....	87
4.2.9	Anzahl der N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Regionen RT1f-alloreaktiver TCR V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen.....	89
4.2.10	CDR3 $\alpha$ -Längen RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen.....	91
4.3	V $\beta$ -REPERTOIRE .....	92
4.3.1	Durchflußzytometrische Analyse des V $\beta$ -Repertoires RT1f- alloreaktiver LEW CD8 T-Zellen .....	92
4.3.2	RT1f-spezifische Alloreaktivität und RT1f-abhängige positive Selektion von V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen sind nicht abhängig von der Paarung mit bestimmten V $\beta$ -Segmenten .....	93
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>131</b>

# 1 EINLEITUNG

Das Immunsystem dient der Abwehr von Bakterien, Viren, Parasiten und körperfremden Proteinen und der kontinuierlichen Elimination pathologisch veränderter (z. B. maligne entarteter) Zellen. Für eine erfolgreiche Verteidigung des Körpers gegen körperfremde Substanzen ist die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen körperfremd und körpereigen notwendig. Dazu kommt das Erfordernis, eine sehr große Diversität körperfremder Stoffe erkennen zu können. Unser Immunsystem kann hochspezifisch Millionen verschiedener Antigene erkennen und, wenn erforderlich, eliminieren. B-Zellen und T-Zellen sind die Träger der spezifischen Immunantwort. Sie stammen von einer gemeinsamen Knochenmarksstammzelle ab und erhielten ihre Namen nach ihrem wichtigsten Entwicklungsort: B-Zellen reifen im Bursa-Fabricsii-Äquivalent (Säugetiere: Knochenmark, daneben fötale Leber) zu naiven reifen B-Zellen, T-Zellen reifen meist im Thymus. Knochenmark und Thymus werden als primäre (zentrale) lymphoepitheliale Organe den sekundären (peripheren) lymphatischen Organen, nämlich Milz, Lymphknoten (LK), Tonsillen und mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), gegenübergestellt.

B-Zellen sind die Träger der humoralen Immunantwort. Sie produzieren Immunglobuline (Antikörper), die entweder als Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert oder sezerniert werden und dann z. B. Viren- und Bakterientoxine inaktivieren. Eine B-Zelle produziert Antikörper mit nur einer Spezifität. Höhere Säuger besitzen  $10^6$  bis  $10^8$  verschiedene Antikörperspezifitäten.

Die T-Zellen, Träger der zellulären Immunantwort, zu deren Aufgaben neben der Zytotoxizität auch die Regulierung der Aktivität anderer T-Zellen und B-Zellen gehört, exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zellrezeptor (TCR), der strukturell den Immunglobulinen der B-Zellen ähnelt, jedoch nicht sezerniert werden kann. Es lassen sich zwei T-Zelltypen unterscheiden:  $\alpha\beta$  T-Zellen, die TCR aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette exprimieren und bei Mensch (Groh et al., 1989), Ratte (Lawetzky et al., 1990) und Maus (Itohara et al., 1989) in peripheren lymphatischen Organen die größte T-Zellpopulation darstellen, und  $\gamma\delta$  T-Zellen mit  $\gamma\delta$ TCR. Das Verhältnis  $\alpha\beta$  T-Zellen zu  $\gamma\delta$  T-Zellen beträgt bei Ratte und Maus in Blut und LK ca. 20 : 1 (Broker et al., 1991).



Abb. 1: Lymphozyt der LEW Ratte (elektronenmikroskopische Aufnahme, 12 800-fache Vergrößerung, Foto: Dr. N. Deutschländer).

### 1.1 Der $\alpha\beta$ T-Zellrezeptor

Der  $\alpha\beta$ TCR ist ein Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Jede Kette besitzt zwei extrazelluläre Domänen, eine variable Domäne, die der spezifischen Antigenerkennung dient, und eine konstante Domäne (Abb. 2a). Die variable Domäne der  $\alpha$ -Kette wird von zwei Genabschnitten kodiert:  $V\alpha$  und  $J\alpha$ ; die der  $\beta$ -Kette von drei Abschnitten:  $V\beta$ ,  $D\beta$  und  $J\beta$  (Abb. 2b). Die konstanten Domänen werden jeweils von einem Exon, nämlich  $C\alpha$  bzw.  $C\beta$ , kodiert (V: variable, D: diversity, J: joining, C: constant; Davis und Bjorkman, 1988; Morris, 1988). Ein kurzes Segment verbindet die konstanten Domänen mit der Membran. Die



Transmembranhelices des TCR enthalten positiv geladene Reste. Ins Zytosol ragt ein zytoplasmatischer Schwanz, der zu kurz ist, um an der Signaltransduktion beteiligt zu sein (Romeo et al., 1992). Die Bindung einer kompletten  $\alpha$ - an eine komplette  $\beta$ -Kette nach Durchtrennung der Disulfidbrücke ist mit einer Dissoziationskonstante von ca.  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  M sehr schwach (Pecorari et al., 1999).

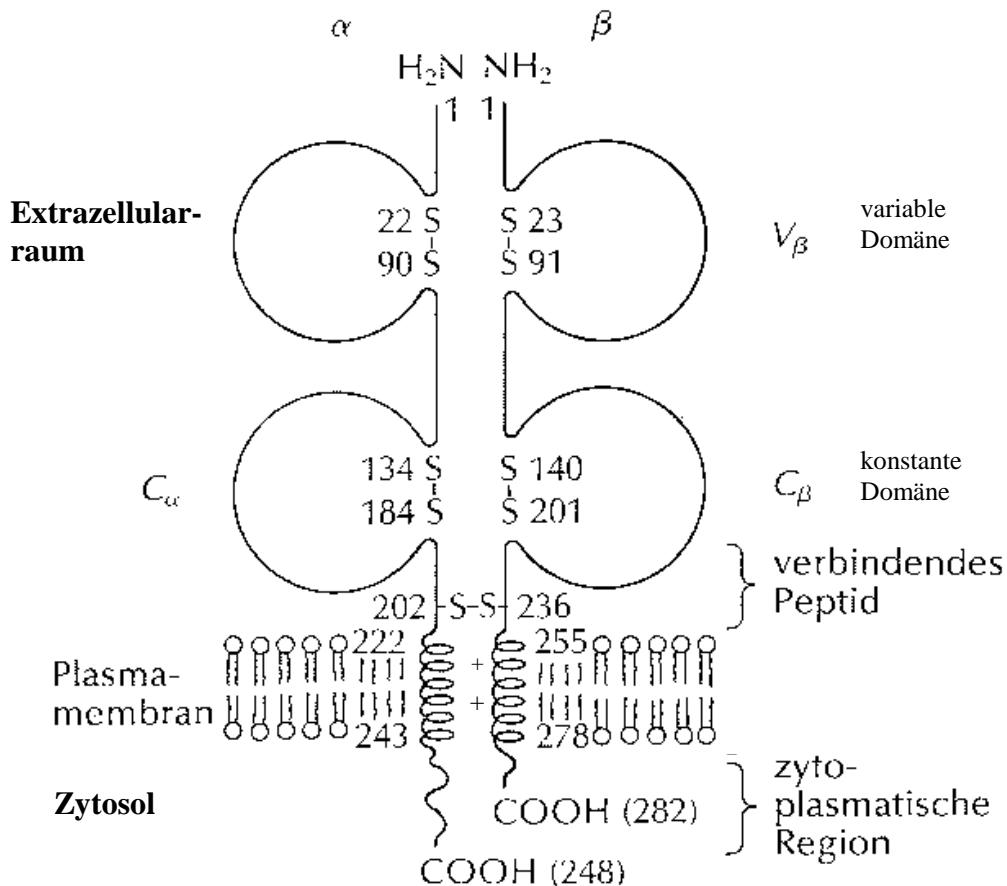


Abb. 2a: Struktur des auf der Zelloberfläche exprimierten  $\alpha\beta$  T-Zellrezeptors.

Hypervariable AS im  $V\alpha/J\alpha$ - bzw.  $V\beta/D\beta/J\beta$ -Übergangsbereich bilden eine Interaktionsfläche zwischen  $V\alpha$ - und  $V\beta$ -Domänen aus und beeinflussen so erheblich die Paarung dieser Domänen (Garcia et al., 1999).

Der TCR ist nicht-kovalent mit einem Komplex von fünf verschiedenen nicht-polymorphen Peptidketten assoziiert, dem CD3-Komplex, der eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion besitzt (Cantrell et al., 1985 und 1998; Samelson et al., 1986;

Klausner und Samelson, 1991). Die fünf konstanten Komponenten des CD3 Komplexes werden als gamma-, delta-, epsilon-Kette, zeta-zeta und zeta-eta Disulfiddimer bezeichnet (Sussman et al., 1988; Frank et al., 1990; Janeway, 1992; Malissen, 1996). Die zytoplasmatischen Abschnitte des TCR/CD3 Komplexes besitzen Motive, die vielen signaltransduzierenden Rezeptoren gemein sind und immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM) genannt werden. CD3 gamma-, delta- und epsilon-Kette besitzen jeweils ein ITAM, die zeta-Kette besitzt drei ITAM (Reth et al., 1989; Osman et al., 1996).

Nach der "one cell - one receptor rule" exprimiert eine Zelle im allgemeinen nur einen spezifischen Rezeptor. Allerdings ist die allelische Exklusion der  $\alpha$ -Kette nicht in allen T-Zellen realisiert, so daß gelegentlich auch zwei Rezeptoren ( $\alpha_1\beta$ ,  $\alpha_2\beta$ ) exprimiert werden (Marche und Kindt, 1986; Elliott und Altmann, 1995). Wenn eine T-Zelle nach Antigenkontakt proliferiert, so exprimiert der gesamte Zellklon denselben Rezeptor.

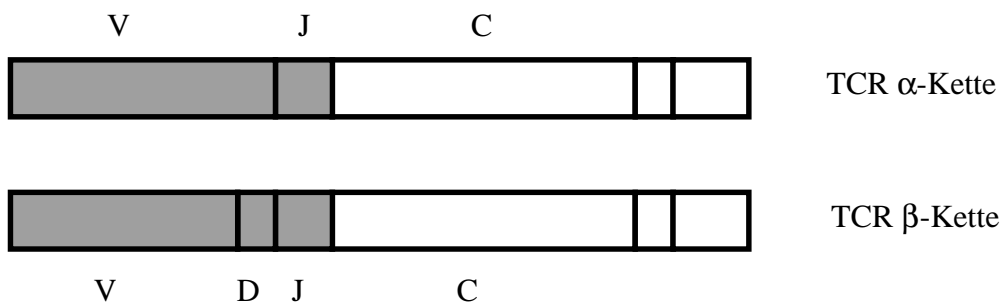


Abb. 2b: Anordnung der TCR-Segmente.  
 V: variable; D: diversity; J: joining; C: constant  
 variable Domäne: grau; konstante Domäne: weiß

## 1.2 Organisation der T-Zellrezeptorgene der Ratte

In der Keimbahnkonfiguration aller somatischen Zellen von Mensch und Nager sind zur Kodierung der TCR  $\alpha$ -Kette verschiedene  $V\alpha$ -Gene 5' von  $J\alpha$ -Genen angeordnet, welche wiederum 5' von einem  $C\alpha$ -Gen liegen. Für die TCR  $\beta$ -Kette besitzen Mensch

und Nager zwei C $\beta$ -Gene. 5' von den C $\beta$ -Genen sind jeweils mehrere J $\beta$ - und ein D $\beta$ -Gen lokalisiert (Chan und Mak, 1989).

Bei der Ratte sind über 100 verschiedene V $\alpha$ -Gene, ca. 50 J $\alpha$ -Gene und ein C $\alpha$ -Gen bekannt (Shirwan et al., 1993; Torres-Nagel et al., 1998). Die Anzahl der exprimierten V $\alpha$ -Gene der Ratte wird auf 63 geschätzt (Torres-Nagel et al., 1998). Zwischen V $\alpha$ - und J $\alpha$ -Clustern liegen TCR $\delta$ -Gene. Für die TCR  $\beta$ -Kette der Ratte steht in der Keimbahnkonfiguration eine Auswahl von 24 V $\beta$ -, 2 D $\beta$ -, 12 J $\beta$ - und 2 C $\beta$ -Genen zur Verfügung. Die beiden C $\beta$ -Gene sind fast identisch, 5' von ihnen sind jeweils 6 J $\beta$ -Gene und ein D $\beta$ -Element lokalisiert (Williams et al., 1991). Abb. 3 verdeutlicht die Organisation der TCR-Gene der Ratte.

Beim Menschen befinden sich die TCR $\alpha$ -Gene auf dem Chromosom 14q11.2 und die TCR $\beta$ -Gene auf dem Chromosom 7q35 (Folch und Lefranc, 2000; Moffatt et al., 2000).

In reifen T-Zellen liegen die Gene in veränderter Anordnung vor. Sie sind umgeordnet oder rearrangiert worden. Dieser Vorgang wird als somatische Rekombination bezeichnet. Die somatische Rekombination findet in der frühen Phase der Reifung im Thymus statt, und zwar in der Reihenfolge  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\beta$ -,  $\alpha$ -Locus (von Boehmer, 1990). Dabei werden jeweils ein V-, ein J- und bei  $\beta$ -Ketten auch ein D-Gen miteinander verknüpft. Die zwischen diesen ausgewählten Elementen liegenden Gene werden deletiert (Abb. 3). Beim Rearrangement der  $\beta$ -Kette findet zuerst die Verknüpfung D/J statt, dann reiht sich ein V-Gensegment an (Born et al., 1985).

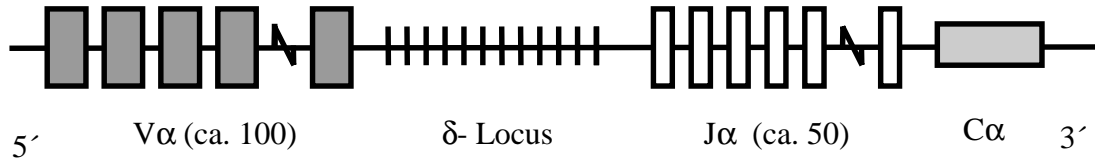
An den V/J, V/D- und D/J-Übergängen beobachtet man häufig Insertionen sogenannter N-Nukleotide. Dabei handelt es sich um einzelne, zufällig ausgewählte Nukleotide, die nicht im Keimbahngenom vorliegen, sondern von der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) eingefügt werden (Landau et al., 1987; Komori et al., 1993). Sie tragen wie die zufällige Paarung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten zur Erhöhung der TCR-Variabilität bei (Davis und Bjorkman, 1988). Auch die Insertion kurzer P-Sequenzen, auch P-Nukleotide genannt (= palindrome, d. h. gegenläufige Sequenzen), erhöht die TCR-Variabilität. Inseriert werden zumeist ein oder zwei P-Nukleotide (Lafaille et al., 1989). Als Palindrom bezeichnet man eine Folge von Nukleotiden, die sich von links nach rechts genauso lesen läßt wie von rechts nach links. Die palindrome Insertion besteht aus einer kurzen, gespiegelten Wiederholung („inverted repeat“) eines

unmittelbar benachbarten Gensegments. Diese entsteht wahrscheinlich durch vorübergehende Bildung eines DNA-hairpins (Übersicht: Lewis, 1994; Coen et al., 1986; Lieber, 1991; „Inter-strand Transfer Model“ zur Entstehung von P-Nukleotiden: Lafaille et al., 1986; „Polymerase Strand Switching Model“: Saedler und Naevers, 1985). Eine Steigerung der TCR-Variabilität kann ferner erzielt werden durch Entfernung von bis zu vier, in Ausnahmen sogar bis zu 11 (Candeias et al., 1991), terminalen, d. h. am V3′-, J5′-, D3′- oder D5′-Ende gelegenen, Nukleotiden durch eine undefinierte Exonukleasenaktivität (Davis, 1988).

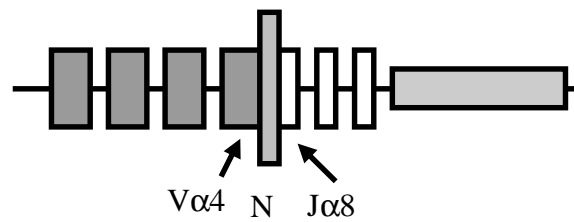
Nach der Rekombination beider TCR Loci im richtigen Leseraster besitzt die Zelle die Fähigkeit zur Bildung eines TCR, dessen variable Domäne der  $\alpha$ -Kette von 1 V- und 1 J-Segment, der  $\beta$ -Kette von 1 V-, 1 D- und 1 J-Segment kodiert wird. In der Maus können theoretisch etwa  $10^{15}$  verschiedene TCR-Spezifitäten gebildet werden. Die tatsächliche Anzahl der TCR-Spezifitäten ist weitaus geringer, nämlich  $10^6 - 10^8$  (Epplen et al., 1987; Davis und Bjorkman, 1988).

Die Verknüpfung eines J $\alpha$ - mit einem V $\alpha$ -Gen geschieht nicht ausschließlich zufällig. Bei Mäusen wurde gezeigt, daß das V $\alpha$ /J $\alpha$ - (Roth et al., 1991) und das V $\beta$ /J $\beta$ -Rearrangement (Candeias et al., 1991) von den genomischen Positionen der V $\alpha$ - und J $\alpha$ -Segmente und vom Alter der Tiere abhängig ist. V $\alpha$ -Gene, die nahe an der J $\alpha$ -Region liegen, paaren sich bevorzugt mit am 5′ Ende liegenden J $\alpha$ -Genen. Dahingegen verknüpft sich ein V $\alpha$ -Gen, welches weit entfernt vom J $\alpha$ -Locus liegt, bei adulten Tieren nur selten mit am 5′ Ende lokalisierten J $\alpha$ -Segmenten. Dies ist wahrscheinlich Folge des „sekundären Rearrangements“, im Laufe dessen ein schon V $\alpha$ /J $\alpha$ -rearrangierter Abschnitt durch ein flankierendes V $\alpha$ - und ein flankierendes J $\alpha$ -Gen, die sich dann verbinden, ersetzt wird. Die Häufigkeit des sekundären Rearrangements differiert wahrscheinlich zwischen adulten und neugeborenen Tieren. TCR von neugeborenen Mäusen besitzen ferner weniger N-Nukleotide als TCR adulter Mäuse (Roth et al., 1991; Bogue et al., 1991). Einflüsse unterschiedlicher Zugänglichkeiten des Chromatins und unterschiedliche Effizienz individueller Rekombinationssignale auf die Auswahl von J $\beta$ -Segmenten, die eine Selektion von Genen während der Rekombination bewirken könnten, werden ferner diskutiert (Candeias et al., 1991).

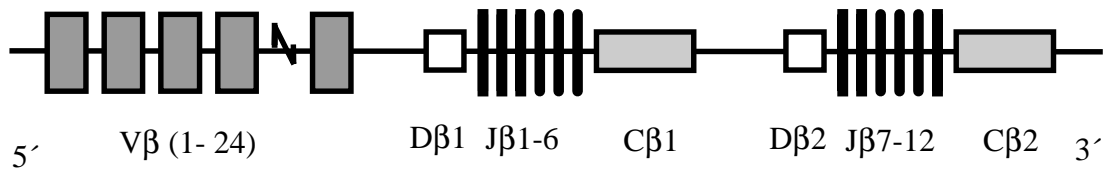
$\alpha$ - Locus: Keimbahn-DNA-Konfiguration



$\alpha$ - Locus:  $\alpha\beta$  T-Zell-DNA nach Rearrangement



$\beta$ - Locus: Keimbahn-DNA-Konfiguration



$\beta$ - Locus:  $\alpha\beta$  T-Zell-DNA nach Rearrangement

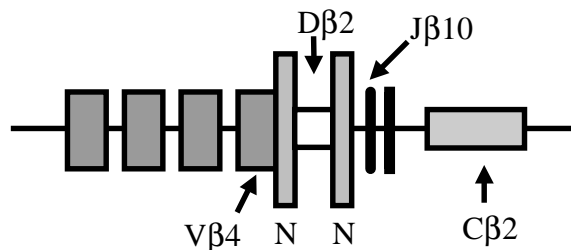


Abb. 3: Modell der Organisation von TCR  $\alpha$ - und  $\beta$ -Genloci der  $\alpha\beta$  T-Zelle der Ratte vor (Keimbahn-DNA-Konfiguration) und nach Rearrangement. Mögliche N-Nukleotid-Insertionspositionen sind dargestellt.

Die  $V\alpha$ - und die  $V\beta$ -Gene bilden Subfamilien, deren Mitglieder definitionsgemäß zu mindestens 75% in der Nukleotidsequenz übereinstimmen. So sind die 24  $V\beta$ -Gene der Ratte in 17 Subfamilien mit je einem Mitglied und drei Subfamilien mit mehreren Mitgliedern ( $V\beta$  3, 5 und 8) organisiert (Smith et al., 1991), während die über 100 verschiedenen  $V\alpha$ -Gene in größeren "multimember subfamilies" organisiert sind (Davis und Bjorkman, 1988; Shirwan et al., 1993 und 1995; Torres-Nagel et al., 1998 und 2001). Beim Menschen sind 54 verschiedene  $V\alpha$ -Gene bekannt, die in 41 Subfamilien organisiert sind, 61  $J\alpha$ -Gene, 1  $C\alpha$ -Gen, 65  $V\beta$ -Gene (30 Subfamilien), 2  $D\beta$ -Gene, 13  $J\beta$ -Gene und 2  $C\beta$ -Gene (Folch und Lefranc, 2000).

### 1.3 MHC-Restriktion

$\alpha\beta$  T-Zellen sind MHC-restringiert (Zinkernagel und Doherty, 1974; Bevan, 1975). Das bedeutet, daß sie Peptidantigene nur erkennen können, wenn sie von einem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekül auf der Zelle präsentiert werden. Die Bindung von Peptiden an oberflächenexprimierte MHC-Moleküle wird Antigenpräsentation genannt. Dabei kommt es zur direkten Interaktion von T-Zellrezeptor (T-Zelle) und MHC-Molekül (antigenpräsentierende Zelle: APC) (Zinkernagel et al., 1978; Townsend et al., 1986). Der Komplex aus MHC-Molekül und Peptid wird im folgenden kurz pMHC genannt.

Der MHC-Komplex ist der polymorphste Genkomplex des Menschen, der bekannt ist. Unter Polymorphismus wird das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Genotypen in einer Population in einem nicht allein den Mutationsraten entsprechenden Verhältnis verstanden. Ein Haplotyp ist ein Komplex gekoppelter Allele, vererbt von einem Elternteil. Jeder heterozygote Organismus besitzt zwei MHC-Haplotypen, die mit Kleinbuchstaben bezeichnet werden. Der MHC-Komplex der Ratte wird RT1 genannt, der des Menschen HLA und der der Maus H-2.

Man unterscheidet MHC-Moleküle der Klasse I und der Klasse II. Das auf der Zelloberfläche exprimierte MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ -Kette (schwere Kette), welche drei MHC-kodierte Domänen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) besitzt, sowie dem nicht

MHC-kodierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M). Ein Spalt zwischen den Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , dessen Seiten von  $\alpha$ -Helices und dessen Grund von  $\beta$ -Faltblattstrukturen der membranfernen Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  gebildet wird („peptidbindender Spalt“ zwischen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domäne), ist zur Bindung eines Peptidantigens befähigt (Cockfield und Halloran, 1989). Konservierte Seitenketten (Tryptophan-167 und Tyrosin-84) des MHC-Moleküls verschließen den peptidbindenden Spalt an beiden Enden. Röntgenstrukturanalysen zeigten, daß die TCR V $\alpha$ -Domäne über der  $\alpha 2$ -Helix und die TCR V $\beta$ -Domäne über der  $\alpha 1$ -Helix des MHC-Moleküls liegt (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996). Die isolierte  $\alpha 3$ -Domäne ist zur Bindung von  $\beta_2$ M und CD8 $\alpha\alpha$ -Dimeren befähigt (Collins et al., 1995; Whitman et al., 2000; s. Kap. 1.4).

Das MHC-Klasse-II-Molekül besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette, die jeweils zwei MHC-kodierte Domänen besitzen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ; Chang et al., 1983; Ohnishi, 1984). Das Klasse-II-Molekül besitzt einen sehr ähnlichen peptidbindenden Spalt, der jedoch an den Enden nicht verschlossen ist. Seine Seiten werden von  $\alpha$ -Helices der membranfernen  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Domänen und sein Grund von  $\beta$ -Faltblattstrukturen (ebenfalls  $\alpha 1$  und  $\beta 1$ ) gebildet. Röntgenstrukturanalysen von TCR/MHC-Komplexen zeigten, daß die TCR V $\alpha$ -Domäne über der  $\beta 1$ -Helix und die TCR V $\beta$ -Domäne über der  $\alpha 1$ -Helix liegt (I-Ak/D10 TCR: Reinherz et al., 1999).

Bei der Ratte kodieren die MHC-Regionen A und C für Klasse-I-Moleküle und die MHC-Regionen B und D für Klasse-II-Moleküle (Übersicht: Butcher und Howard, 1986). Abb. 4 und Abb. 5 zeigen MHC-Klasse-I-Moleküle im Komplex mit TCR und Peptidantigen (Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996; s. Kap. 1.6). Abb. 6 zeigt das MHC-Klasse-I-Molekül RT1A<sup>f</sup> der Ratte und seine Kontaktpunkte mit dem TCR V $\alpha$ -Segment (Torres-Nagel et al., 2001). Das Modell wurde mit bekannten MHC-Molekül-Koordinaten erzeugt, die TCR-Kontaktpunkte wurden basierend auf Röntgenstrukturanalysen vorhergesagt (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996; Ding et al., 1998).

Während alle kernhaltigen Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren, werden Klasse-II-Moleküle nur von wenigen Zelltypen (epitheliale Thymuszellen: TEC, T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Langerhans-Zellen/dendritische Zellen) exprimiert. Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen sind die wichtigsten „professionellen“ APC.

Astrozyten, die wahrscheinlich Apoptose autoreaktiver T-Zellen induzieren können, gehören zu den ZNS-spezifischen APC, ebenso wie Schwannsche Zellen im peripheren Nervensystem (Gold et al., 1996).

Prozessierte Antigene, die von Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (z. B. virale Peptide, zytosolische Selbst-Peptide), werden über MHC-kodierte Peptidpumpen (transporters associated with antigen processing: TAP) in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort binden sie an vor der Peptidbindung noch instabile Dimere aus schwerer Kette ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ ) und  $\beta_2M$  und werden mit diesen an die Zelloberfläche transportiert (Übersicht: Monaco, 1992). Eine Zelle exprimiert *in vivo* ca.  $10^5$  Kopien eines Klasse-I-Moleküls und präsentiert so etwa  $10^4$  verschiedene Peptide, die aus acht bis 10 Aminosäuren (AS) bestehen (P1 – P8/P10), deren Enden in zwei Taschen verankert sind (Reinherz et al., 1999). Ein Peptid wird 1 bis 1000 mal pro Zelle präsentiert (Hunt et al., 1992). Zytosolische Selbst-Peptide stammen z. B. von ribosomalen Proteinen und Histonen.

MHC-Klasse-II-Moleküle präsentieren extrazelluläre, endozytierte Antigene. Diese Antigene gelangen zur Zelloberfläche, nachdem sie in endoplasmatischen Vesikeln mit MHC-Klasse-II-Molekülen eine Bindung eingegangen (Übersicht: Neefjes und Ploegh, 1992). MHC-Klasse-II-präsentierte Peptide besitzen eine Polyprolin Typ II Konformation. Sie bestehen aus 15 bis 20 AS, über Wasserstoffbrücken ist das Peptid in seiner gesamten Länge mit dem MHC-Molekül verbunden (Stern und Wiley, 1994; Madden, 1995; Jones, 1997).

Eine APC exprimiert insgesamt ca.  $10^5$  MHC-Moleküle, die eine hohe Anzahl verschiedener Peptide präsentieren (ca. 10 000 Peptide/APC nach Bevan et al., 1994; etwas mehr als 1000 Peptide/APC nach Rammensee et al., 1993). Eine T-Zelle trägt ca. 30 000 TCR. Ein TCR einer CD4+ T-Zelle kann hochspezifisch nur ca. 10 bis 100 MHC-Peptid-Komplexe erkennen (Demotz et al., 1990; Harding und Unanue 1990), ein TCR einer zytotoxischen T-Zelle vielleicht sogar nur einen einzigen Komplex (Sykulev et al., 1996). T-Zellaktivierung kann eintreten, wenn nur 0,08% der MHC-Klasse-I-Moleküle einer APC ein Peptid präsentieren, das der TCR erkennen kann (Christinck et al., 1991).



## 1.4 Die Korezeptoren CD4 und CD8

$\alpha\beta$  T-Zellen exprimieren entweder CD4 oder CD8 (CD: cluster of differentiation; Abkürzung zur Bezeichnung von Zelloberflächenmolekülen). CD4 und CD8 sind nicht-polymorphe Korezeptoren, welche die Bindung des T-Zellrezeptors an das MHC-Molekül unterstützen.

CD4 T-Zellen sind MHC-Klasse-II-, CD8 T-Zellen MHC-Klasse-I-restringiert (Übersicht: von Boehmer, 1988). Liganden für CD4 und CD8 sind nicht-polymorphe Bereiche der MHC-Moleküle. Die Interaktion findet wahrscheinlich auf konservierte Weise statt. CD4 bindet an die membrannahere  $\beta$ 2-Domäne des MHC-Klasse-II-Moleküls, während CD8 an die ebenfalls membrannahere  $\alpha$ 3-Domäne des MHC-Klasse-I-Moleküls bindet (CD4: König et al., 1992; Moebius et al., 1993; CD8: Salter et al., 1990; Gao et al., 1997; Kern et al., 1998). Es gibt Hinweise für eine direkte Interaktion der Korezeptoren mit dem TCR (Dianzani et al., 1991; Luescher et al., 1995; Janeway und Bottomly, 1996).

CD4 ist ein monomeres, vier immunglobulinartige Domänen enthaltendes Glykoprotein. CD8 bildet Isomere: es liegt entweder als Homodimer aus zwei  $\alpha$ -Ketten (CD8 $\alpha\alpha$ ) oder als Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette vor (CD8 $\alpha\beta$ ). CD8  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sind nicht polymorph (Übersicht: Littman, 1987) und wurden auf Protein- und DNA-Ebene identifiziert (Johnson et al., 1985; Johnson und Williams, 1986). Monoklonale Antikörper zur Unterscheidung der Isomere existieren (Brideau et al., 1980; Torres-Nagel et al., 1992). Thymusabhängige, d. h. im Thymus gereifte, zytotoxische MHC-Klasse-I-restringierte T-Zellen von Mensch, Maus und Ratte exprimieren mehrheitlich CD8 $\alpha\beta$  (Ledbetter et al., 1980; Shiue et al., 1988). Periphere CD8 T-Zellen und Thymozyten der Ratte exprimieren sogar zu annähernd 100% die heterodimere Isoform des CD8-Moleküls. Extrathymisch gereifte Zelltypen exprimieren dagegen mehrheitlich CD8 $\alpha\alpha$  (Reynolds et al., 1981; Moebius et al., 1991; Guy-Grand et al., 1991; Rocha et al., 1991).

Zytolyse (vermittelt durch Perforin oder Granzyme) und Sekretion von IFN- $\gamma$ , Interleukinen und Tumornekrosefaktoren sind die wichtigsten Effektorfunktionen der T-Zellen (Übersicht: Trinchieri et al., 1995; Vooijs et al., 1995; Prevost-Blondel et al., 2000). Naive CD8 T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen. Zellen, die mit

Viren oder Bakterien infiziert sind, die sich im Zytosol vermehren, werden durch die zytotoxischen CD8 T-Zellen eliminiert. Hauptfunktion der CD4 T-Zellen ist die Modulation der Aktivitäten anderer Zellen des Immunsystems, z. B. von Makrophagen oder B-Zellen.

Neben dem durch CD4 bzw. CD8 vermittelten Signal existieren zur initialen Aktivierung ruhender T-Zellen weitere kostimulierende Signale. CD28 der T-Zelle vermittelt über eine Steigerung der IL-2-Produktion ein kostimulierendes Signal (Azuma et al., 1992; Übersicht: Favero und Lafont, 1998). Der CD28-Ligand B7 (B7.1, B7.2) befindet sich in hoher Konzentration auf professionellen APC (Übersicht: Harris und Ronchese, 1999).

## 1.5 Positive und negative Selektion im Thymus

Im Thymus finden Rekombination der TCR-Gene, Selektion und Differenzierung der T-Zellvorläufer statt. Es lassen sich verschiedene T-Zellpopulationen anhand der Expression von  $\alpha\beta$ TCR, CD4 und CD8 unterscheiden (von Boehmer, 1988).

T-Zellvorläufer, die von Knochenmark oder fötaler Leber stammen und weder CD4, noch CD8 ( $\rightarrow$  doppelt negativ, DN), noch einen TCR exprimieren, erreichen die äußere Thymusrinde. Sie wandeln sich in doppelt positive (DP) Thymozyten um, nachdem sie zuerst CD8 (Maus und Ratte) oder CD4 (Maus) hochregulierten ( $\rightarrow$  unreife single/einzeln positive, SP, dann DP). Als DP Thymozyten exprimieren sie bereits  $\alpha\beta$ TCR in geringer Dichte ( $\rightarrow$  TCR<sup>low</sup> Kompartiment). 70% - 80% der Thymozyten sind TCR<sup>low</sup> DP Thymozyten. Im folgenden wird der TCR hochreguliert, und die Expression von CD4 oder CD8 wird beendet ( $\rightarrow$  reife TCR<sup>high</sup> SP Zelle; Reinherz et al., 1980; Fowlkes und Pardoll, 1989; Kruisbeek, 1993). In die Peripherie gelangen vor allem reife TCR<sup>high</sup> SP T-Zellen. Die Mechanismen der positiven und negativen Selektion erlauben nur einem Bruchteil der Thymozyten die Differenzierung zu reifen T-Zellen (3% - 5% nach Shortman et al., 1990).

Bei der vor der negativen Selektion stattfindenden positiven Selektion erhalten nur die Thymozyten ein Signal zum Überleben, deren TCR Selbst-MHC-Peptid-Komplexe der kortikalen epithelialen Thymuszellen (c-TEC) erkennen können (von Boehmer, 1994;

Anderson et al., 1994, 1998 und 1999; Wilkinson et al., 1995; Ernst et al., 1996). Thymozyten, die keine Bindung zum MHC-Molekül eingehen können, unterlaufen nach wenigen Tagen das Programm der Apoptose (programmed cell death, PCD; Kieselow und Miazek, 1995; Übersicht: Matiba et al., 1997). Die genaue Entwicklungsstufe der Thymozyten während der positiven Selektion wird noch diskutiert. Wahrscheinlich werden kleine Thymozyten des Phänotyps  $\text{TCR}^{\text{low}}$  DP der positiven Selektion unterzogen (Kieselow et al., 1988; Smith et al., 1989; Shortman et al., 1990; Swat et al., 1993; Merckenschläger et al., 1997), und  $\text{TCR}^{\text{int}}$  DP Thymozyten (TCR-Dichte zwischen  $\text{TCR}^{\text{low}}$  und  $\text{TCR}^{\text{high}}$ ; Shortman et al., 1991) oder  $\text{TCR}^{\text{high}}$  DP Thymozyten (Swat et al., 1992) sind bereits positiv selektioniert. Die Differenzierung zu  $\text{TCR}^{\text{low}}$  Thymozyten wird durch den prä-TCR-Komplex vermittelt (von Boehmer und Fehling, 1997). Unreife DP Thymozyten können sich nicht teilen und besitzen eine Lebensdauer von nur drei bis fünf Tagen, wenn sie nicht positiv selektioniert werden (Egerton et al., 1999).

Während der positiven Selektion werden die  $\alpha$ -Kettengene mehrfach umstrukturiert, wohingegen die Rekombination im  $\beta$ -Kettenlocus bereits abgeschlossen ist. So kann dieselbe Zelle verschiedene  $\alpha$ -Ketten zusammen mit einer konstanten  $\beta$ -Kette exprimieren, was ihre Chance, eine Bindung zum MHC-Molekül der c-TEC eingehen zu können, vergrößert. Nach der positiven Selektion ist die Rekombination des  $\alpha$ -Kettenlocus abgeschlossen (von Boehmer, 1992).

Die Entscheidung, ob ein Thymozyt CD4 oder CD8 exprimieren wird, fällt wahrscheinlich während der positiven Selektion und richtet sich nach der Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekül ( $\rightarrow$  der Thymozyt differenziert zur CD8 SP T-Zelle) oder MHC-Klasse-II-Molekül ( $\rightarrow$  Reifung einer CD4 SP T-Zelle) durch den  $\alpha\beta$ TCR (Teh et al., 1988; Kaye et al., 1989; Blackman et al., 1990; von Boehmer, 1990). Wahrscheinlich erfolgt diese Festlegung zu Beginn der positiven Selektion (Dyall et al., 1995; Punt et al., 1996; Vanhecke et al., 1997; Hare et al., 1998). Das „instruction model“ besagt, daß die Ligation von TCR und CD4 oder CD8 des DP Thymozyten spezifische Signale bewirkt, die zur Herunterregulation des jeweils nicht-ligierten („unpassenden“) Korezeptors führen. Demgegenüber besagt das stochastische „selection model“, daß die Expression eines Korezeptors zufällig terminiert wird und die Zelle nur dann weiter differenziert,

wenn es sich dabei um den „unpassenden“ Korezeptors gehandelt hat (Teh et al., 1988; Chan et al., 1993; Davis et al., 1993; van Meerwijk und Germain, 1993 und 1994).

Die negative Selektion führt zum Zelltod von bis zu 80% der positiv selektionierten Thymozyten (van Meerwijk et al., 1997). Das Signal zur negativen Selektion wird wiederum durch den TCR vermittelt, dessen Ligand wie bei der positiven Selektion ein Komplex aus Selbst-MHC-Molekül und Selbst-Peptid ist. Der Phänotyp der Thymozyten während der negativen Selektion wurde lange diskutiert (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988; Schneider et al., 1989; Kishimoto und Sprent, 1997). TCR<sup>low</sup> DP sind unselektionierte Thymozyten, nach positiver und negativer Selektion besitzen Thymozyten den Phänotyp TCR<sup>high</sup> SP.

Selektionierte TCR<sup>high</sup> SP Zellen der Maus verlassen das Thymusmark nach durchschnittlich 14 Tagen, in denen weitere Reifungsprozesse stattfinden (z. B. CD62L Hochregulation; Scollay et al., 1995; Gabor et al., 1997).

Verschiedene Modelle versuchen zu erklären, wie der TCR/pMHC-Kontakt sowohl ein Signal, das reifende Thymozyten vor dem Zelltod rettet, als auch ein potentiell autoreaktive Thymozyten deletierendes Signal übertragen kann. Quantitative Modelle postulieren, daß Affinität, Avidität oder Kinetik des TCR entscheiden, ob positiv oder negativ (oder nicht) selektioniert wird, während in qualitativen Modellen Änderungen der TCR-Konformation Modulationen der Signaltransduktion bewirken (z. B. Janeway, 1995; Germain, 1997; s. Kap. 1.6). Unter (intrinsischer) Affinität wird die Stärke, mit der ein Molekül an ein Epitop eines zweiten Moleküls bindet, verstanden. Avidität beschreibt die Gesamtbindungsstärke zwischen zwei Molekülen oder zwei Zellen.

Mäuse, die  $\beta_2$ -Mikroglobulin oder die MHC-kodierten Peptidtransporter TAP nicht exprimieren ( $\beta_2$ M oder TAP „knockout“ Mäuse), exprimieren keine stabilen MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche. CD8 T-Zellen dieser „knockout“-Mäuse können nur sehr eingeschränkt positiv selektioniert werden. Nach Zugabe von exogenem MHC-Klasse-I-Molekül bindenden Peptid (TAP knockout) oder Peptid und  $\beta_2$ M ( $\beta_2$ M knockout) zu fötaler Thymusorgankultur (FTOC) wird die MHC-Molekül-Expression und damit die positive Selektion rekonstituiert (Ashton-Rickardt et al., 1994; Hogquist et

al., 1994). TCR transgene Mäuse exprimieren nur einen TCR (in der Regel bekannter Spezifität).

1994 beschrieben Hogquist et al. ( $\beta_2M$  knockout), Sebzda et al. ( $\beta_2M$  knockout) und Ashton-Rickardt et al. (TAP knockout) bei TCR transgenen Mausmodellen positiv selektionierende TCR-Peptidliganden, die mit dem nominalen, d. h. in der Peripherie T-Zellaktivierung bewirkenden, Antigen nahe verwandt sind, jedoch eine etwas niedrigere TCR-Affinität besitzen. Sebzda und Ashton-Rickardt beschrieben, daß allein durch Dosiserhöhung des potentiell positiv selektionierenden Peptids (von  $3 \times 10^{-5}$  M auf  $3 \times 10^{-4}$  M bzw. von  $10^{-12}$  M auf  $10^{-6}$  M) auch negative Selektion bewirkt werden konnte. Beide Autoren untersuchten denselben lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-Peptid-spezifischen H2-D<sup>b</sup>-restringierten TCR (P14). Sie postulierten, daß positive Selektion ausschließlich peptidspezifisch und empfindlich für eine extrem niedrige Ligandendichte sei (Sebzda et al., 1994; Ashton-Rickardt et al., 1994).

Ashton-Rickardt et al. entwickelten 1994 aufgrund weiterer Beobachtungen an P14 TCR transgenen TAP knockout Mäusen das „differential-avidity model“ mit vier möglichen Ergebnissen der TCR/pMCH-Interaktion (aufgeführt nach zunehmender Avidität): keine Selektion der T-Zelle; positive Selektion; negative Selektion; periphere T-Zellaktivierung. Avidität wird von den Autoren definiert als Produkt der intrinsischen Affinität eines TCR zum jeweiligen pMHC-Liganden, der Dichte der TCR eines Thymozyten und der Dichte der pMHC-Liganden der APC. Avidität ist so definiert ein Maß für die Anzahl von bindenden TCR pro Zelle und Zeiteinheit. Das „differential-avidity model“ erweitert das „differential-affinity model“ (Sprent et al., 1988), in dem Dichte von TCR und pMHC nicht berücksichtigt waren.

Alam et al. beschrieben 1996 ebenfalls eine Korrelation zwischen Avidität der T-Zell/APC-Interaktion und Ergebnis der Signaltransduktion (Selektion, periphere T-Zellaktivierung) bei 42.12 TCR transgenen Mäusen (H-2K<sup>b</sup>-Restriktion). Der Einfluß von Peptidliganden, die sich in ihrer Fähigkeit, die periphere T-Zelle zu aktivieren, unterschieden (Agonisten, Antagonisten, gemischte Agonisten), auf die TCR-Kinetik wurde analysiert. Ein TCR-Agonist bewirkt in der Peripherie T-Zellaktivierung; ein TCR-Antagonist bindet an den TCR, ohne ein Aktivierungssignal zu erzeugen (De Magistris et al., 1992). Dissoziationskonstanten ( $K_d$ )  $< 10 \mu\text{M}$  bewirkten negative Selektion,  $K_d$  zwischen  $20 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$  positive Selektion, bei einer  $K_d$  von  $362 \mu\text{M}$

fand keine Selektion statt. Da Liganden, die TCR-Konformationsänderungen bewirken, langsame on- und off-rates besitzen müßten, jedoch gezeigt wurde, daß Agonisten schnellere on- und off-rates als Antagonisten besitzen, folgerten Alam et al., daß ihre Ergebnisse gegen qualitative Modelle der TCR-Signaltransduktion bei positiver und negativer Selektion sprechen. Eine strenge Korrelation ausschließlich zwischen off-rate (Dissoziationsgeschwindigkeit) des TCR/pMHC und Ergebnis der Signaltransduktion bestand jedoch nicht (vgl. „model of kinetic proofreading“: McKeithan et al., 1995; „model of kinetic editing“ und „discrimination model“: Rabinowitz et al., 1996).

Peptidagonisten können Thymozyten negativ selektionieren, und umgekehrt können Peptide, die die Fähigkeit zur Aktivierung reifer T-Zellen nicht besitzen, Thymozyten positiv selektionieren. Dabei kann ein einziges Peptid ein sehr vielfältiges TCR-Repertoire erzeugen (Jameson et al., 1994 und 1995). Zahlreiche Hinweise für die Existenz positiv selektionierender Selbstpeptide wurden erbracht (z. B. Sant Angelo et al., 1997), und natürlich vorkommende positiv selektionierende Peptidliganden wurden identifiziert (Hogquist et al., 1997; Hu et al., 1997). Kathepsin L-defiziente Mäuse, die vermindert Selbst-Peptide exprimieren, selektionieren weniger CD4 T-Zellen positiv (Nakaawa et al., 1998). Auf das Erfordernis eines limitierten Satzes spezifischer Selbst-Peptide für die positive Selektion wurde hingewiesen (Baldwin et al., 1999; Barton et al., 1999).

Der Beitrag des MHC-Molekül-präsentierten Peptidantigens zur negativen und positiven Selektion wird jedoch kontrovers diskutiert. Es wurde darauf hingewiesen, daß die Detektion einer MHC-spezifischen Selektion durch Interaktionen von niedriger Affinität zwischen TCR und in hoher Dichte vorhandenen MHC-Molekül-Epitopen in Modellen, von denen eine ausschließliche Peptidspezifität der Selektion abgeleitet wurde, häufig ausgeschlossen war (Bevan et al., 1994; Schuhmacher und Ploegh, 1994). Wegen der geringen Komplementarität von Selbst-Peptid und TCR-Bindungsfläche, die Röntgenstrukturanalysen feststellten, wurde vermutet, daß positiv selektionierende Selbst-Peptide nicht für einen TCR hochspezifisch sind, sondern daß eine hohe Kreuzreaktivität mit vielen TCR besteht (Garcia et al., 1998; s. Kap. 1.6).

Die „altered ligand hypothesis“ (Marrack und Kappler, 1988) besagt, daß unterschiedliche Zelltypen positive bzw. negative Selektion bewirken: kortikale Epithelzellen (c-TEC), die einen hochspezifischen Satz von Peptiden präsentieren sollen,

die nicht von anderen Zellen exprimiert würden, sollen positiv selektionieren. Aus dem Knochenmark stammende Zellen, die im Thymusmark lokalisiert seien, sollen als „Repräsentanten der Peripherie“ negative Selektion bewirken. Die Analyse eluierter Thymuspeptide (Hugo et al., 1993) sowie die Beobachtungen, daß dasselbe Peptid sowohl positiv als auch negativ selektionieren kann und daß andere Zelltypen neben c-TEC positiv selektionieren können (z. B. Fibroblasten; Hogquist et al., 1994), konnten diese Theorie jedoch nicht bestätigen.

Selektioniert *in vivo* jedes der ca.  $10^4$  natürlichen Selbstpeptide, die auf einer Zelle präsentiert werden, ein T-Zell-Repertoire, oder ist es das „Gemisch“ von Selbstpeptiden, die jeweils nur äußerst niedrige TCR-Affinitäten besitzen, welche sich aber addieren (hohe Ligandendichte), das eine T-Zelle selektioniert? Ein einziges Peptid kann eine detektierbare Population reifer CD8 T-Zellen selektionieren (z. B. Ashton-Rickardt et al., 1993; Hogquist et al., 1993). Die These einer Selektion durch ein „Gemisch“ andererseits wird dadurch gestützt, daß die selektionierenden Liganden aufgrund ihrer äußerst niedrigen Affinität in der Peripherie mit weit geringerer Wahrscheinlichkeit als Agonisten agieren und so autoimmune Reaktionen vermitteln können. Ein komplexes Gemisch aus dem Thymus eluierter Peptide selektioniert weiterhin effektiver positiv als nur ein einzelnes Peptid (Ashton-Rickardt et al., 1993; Hogquist et al., 1993). Beide Formen der Selektion existieren wahrscheinlich nebeneinander.

## 1.6 Der Beitrag von T-Zellrezeptorsegmenten zu Alloreaktivität von T-Zellen und Selektion von Thymozyten

Unter Alloreaktivität versteht man die TCR-vermittelte T-Zellantwort auf Fremd-MHC-Peptid-Komplexe (Simonson, 1967; Ford et al., 1975; Bevan, 1977; Lemonnier et al., 1977; Hünig und Bevan, 1980). Das Phänomen der Alloreaktivität wurde zuerst im Zusammenhang mit der Transplantatabstoßung beschrieben, und die MHC-Moleküle erhielten deshalb zunächst den Namen „Transplantationsantigene“. Die Erkennung von spezifischen endogenen (zelleigene) Peptiden, die von fremden (allogenen) MHC-Molekülen präsentiert werden, kann Alloreaktivität bewirken (Heath et al., 1989 und

1991; Röttschke et al., 1991; Udaka et al., 1992); andererseits wurden auch alloreaktive T-Zellklone identifiziert, die allogene MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen, welche einen hochdiversen Peptidsatz präsentieren (Heath et al., 1991; Röttschke et al., 1991). Alloreaktivität erfordert nach dem „differential-avidity model“ eine höhere Avidität zwischen T-Zelle und APC als positive oder negative Selektion von Thymozyten (Ashton-Rickardt et al., 1994; s. Kap. 1.5). 1 – 10% der peripheren T-Zellen erkennen allogene MHC-Moleküle, denen gegenüber sie noch nicht exponiert waren (Sherman und Chattopadhyay, 1993). Es gibt zwei wichtige Hypothesen zur Erklärung der hohen Frequenz potentiell alloreaktiver T-Zellen. Die erste besagt, daß allogene MHC-Moleküle eines einzigen Haplotyps durch Präsentation von vielgestaltigen endogenen Peptiden mit TCR unterschiedlicher Spezifitäten interagieren können. Die Erkennung des Peptids durch den TCR ist dabei wesentlich (Matzinger und Bevan, 1977). Eine zweite Hypothese besagt, daß die alloreaktive T-Zelle vor allem oder gar ausschließlich direkt mit dem allogenen MHC-Molekül interagiert und der Beitrag des präsentierten Peptids gering bzw. indirekt ist (z. B. Stabilisierung des MHC-Moleküls auf der Zelloberfläche, keine Verhinderung des Kontakts von TCR und MHC-Molekül durch sperrige Seitenketten). Da dann alle allogenen MHC-Moleküle potentielle TCR-Liganden der TCR von alloreaktiven Zellen sind, also eine hohe Dichte von TCR-Liganden herrscht, resultiert trotz niedriger Affinität der einzelnen TCR zum allogenen MHC-Molekül eine hohe Avidität, so daß eine Alloreaktion bewirkt wird („high determinant density hypothesis“: Bevan, 1984).

Drei Schritte sind zur Aktivierung einer reifen CD8 T-Zelle bei Alloreaktionen erforderlich (Übersicht: Shaw und Dustin, 1997). Nach einem Sekunden andauernden initialen Kontakt T-Zelle/APC, vermittelt über Adhäsionsmoleküle und die TCR/pMHC-Bindung, erfolgt in einer zweiten, einige Minuten andauernden Phase die Bildung einer Zone, die frei ist von sperrigen, negativ geladenen Phosphatasen und in der erste Schritte der Signaltransduktion wie Phosphorylierungen ablaufen können. Die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steigt. In der dritten, über mehrere Stunden andauernden Phase erfolgt die Bildung einer stabilen Kontaktzone („cap“), in welcher sich ein spezifischer signaltransduzierender Komplex voll ausbildet (Ullman et al., 1990; Rozdzial et al., 1995; Dustin et al., 1998; Zhang et al., 1998; Koretzky und Boerth, 1999; Finco et al., 1999). Dabei werden multiple Phosphorylierungsschritte am TCR/CD3-Komplex



durchlaufen, die durch Proteintyrosinkinasen (PTK; src-Familie: p56lck, fyn und syk-Familie: ZAP-70, Syk) vermittelt werden (Chan und Shaw, 1996; Yamaguchi und Hendrickson, 1996; Kersh et al., 1998). Wichtigste Bindungsorte der PTK sind die konservierten Signalmotive (ITAM) der TCR zeta- und eta-Ketten (Neumeister et al., 1995; Lowin-Kropf et al., 1998). Jeder dieser drei Schritte erfordert eine stärkere TCR/pMHC-Bindung; reicht die Bindungsstärke nicht aus, erfolgt keine T-Zellaktivierung.

Während die Interaktion der Immunglobuline mit Antigenen sehr detailliert analysiert wurde, gestaltete sich die Beschreibung der Interaktion des TCR mit seinem Liganden schwieriger, da TCR nicht in großer Menge als lösliche Proteine verfügbar waren (Amit et al., 1986). Modelle der Topologie der TCR/pMHC-Interaktionen, die auf dem hohen Grad struktureller Ähnlichkeit der TCR- und Immunglobulingene und der Analyse individueller Komponenten des trimolekularen Komplexes basierten (z. B. Bjorkman et al., 1987; Chothia et al., 1988; Hong et al., 1992; Bentley et al., 1995; Fields et al., 1995) wurden erst 1996 durch die ersten Beschreibungen der dreidimensionalen Röntgenstruktur eines  $\alpha\beta$ TCR von Maus (Garcia et al., 1996) und Mensch (Garboczi et al., 1996) im Komplex mit einem MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden erweitert. Sowohl in der TCR  $\alpha$ - als auch in der TCR  $\beta$ -Kette lassen sich drei hypervariable Regionen unterscheiden: CDR1, CDR2 und CDR3 (CDR: complementarity determining region). Die CDR-Schleifen bilden die Hauptkontakte zum pMHC aus. Während CDR1- und CDR2-Schleifen ausschließlich von TCR V-Genen kodiert werden, wird die am V/(D)/J-Übergangsbereich liegende CDR3-Schleife von Abschnitten der V- und J-Segmente gebildet, sowie in der  $\beta$ -Kette zusätzlich vom D-Segment. Die Variabilität der CDR3-Schleife wird zusätzlich gesteigert durch Einfügung von P-Nukleotiden und nicht genomisch kodierten N-Nukleotiden oder Entfernung von Nukleotiden (s. Kap. 1.2). Die CDR3-Regionen sind die variabelsten Regionen des gesamten TCR.

Verschiedene Modelle der Interaktion des TCR mit einem pMHC-Komplex wurden vor der Veröffentlichung der Röntgenstrukturanalysen vorgeschlagen, in denen die CDR3-Schleifen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette vorwiegend mit dem präsentierten Peptid und die weniger diversen CDR1- und CDR2-Schleifen nur oder überwiegend mit den  $\alpha$ -Helices des MHC-Moleküls interagieren (Davis und Bjorkman, 1988; Claverie et al., 1989; Jorgensen et al., 1992). Polyklonale T-Zellen, die denselben MHC-Peptid-Komplex

erkennen, exprimieren häufig gleiche V $\alpha$ - oder V $\beta$ -Segmente, besitzen also identische CDR1- und CDR2-Schleifen (z. B. Äbischer et al., 1990), was diese Modelle stützt. Casanova et al. fanden 1993 Hinweise für eine Interaktion der TCR J $\beta$ -Segmente mit dem N-terminalen Ende von H-2K<sup>d</sup>-präsentierten Peptiden. Im Modell von Sant'Angelo et al. (1996) kontaktieren neben CDR3 $\alpha$  und CDR3 $\beta$  auch CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  das Peptid, und zwar im N-terminalen Bereich.

Die Änderung der Konformation der CDR-Schleifen scheint ein wichtiger Mechanismus zu sein, um TCR-Spezifitäten zu erweitern. Dies kann die im Vergleich zu Immunglobulinen beschränkte Diversität der TCR-Gene ausgleichen (Kuzushima et al., 1995; Nanda et al., 1995; Ausubel et al., 1996). Nalefski et al. zeigten 1993, daß TCR durch Punktmutationen im Bereich der CDR $\alpha$ -Schleifen die Fähigkeit zur Antigenerkennung verlieren können.

Garboczi et al. beschrieben 1996 die Kristallstruktur eines Komplexes von A6  $\alpha\beta$ TCR, Tax Peptid des human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1) und MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 (Röntgenstrukturanalyse; 2,5 Å). CDR1 und CDR3 (jeweils  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette) kontaktieren das Peptid: CDR3 $\alpha$  und CDR3 $\beta$  kontaktieren den zentralen Peptidbereich, CDR1 $\alpha$  den N-terminalen Peptidbereich und das Peptidzentrum, CDR1 $\beta$  den C-terminalen Peptidbereich. CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$  und CDR3 $\beta$  kontaktieren sowohl konservierte als auch polymorphe Epitope der  $\alpha$ -Helices des MHC-Moleküls. CDR2 $\alpha$  kontaktiert die  $\alpha$ -Helix der  $\alpha$ 2-Domäne. CDR2 $\beta$  und CDR3 $\alpha$  liegen über der  $\alpha$ -Helix der  $\alpha$ 1-Domäne, dabei geht CDR2 $\beta$  jedoch keinen Kontakt ein. CDR1 $\alpha$  kontaktiert  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne, ebenso wie CDR3 $\beta$ . Somit sind sowohl in der Keimbahnsequenz kodierte (CDR1 und CDR2) als auch durch somatische Rekombination entstandene TCR-Regionen (CDR3) an der Interaktion mit dem MHC-Molekül einerseits und mit dem von ihm präsentierten Peptid andererseits beteiligt (Abb. 4). Im Gegensatz zur Strukturanalyse von Garcia et al. (1996, s. u.) sind CDR1 $\beta$  und CDR2 $\beta$  so gut wie nicht an der MHC-Molekül-Interaktion beteiligt. Der A6 TCR besitzt eine flache Kontaktfläche, die durch die CDR-Schleifen gebildet wird, mit einer zentralen Tasche, in der die CDR3-Schleifen konvergieren. Die Oberfläche der MHC-Moleküle besitzt im Interaktionsbereich zwei „Peaks“ (N-terminale Bereiche der  $\alpha$ -Helices von  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Domäne), zwischen diesen liegt der peptidbindende Spalt. Diese

konservierten strukturellen Eigenschaften bedingen eine „diagonale“ Orientierung des TCR zum MHC/Peptid-Komplex.

1996 beschrieben Garcia et al. die Kristallstruktur eines vollständigen, glykosylierten, extrazellulären  $\alpha\beta$ TCR-Bereichs (2C  $\alpha\beta$ TCR), komplexiert mit dem MHC-Klasse-I-Molekül der Maus H-2K<sup>b</sup> und dem Selbst-Peptid dEV8 (Röntgenstrukturanalyse; 2,5 Å). Die TCR-Oberfläche im Interaktionsbereich ist bis auf eine tiefe hydrophobe Rinne zwischen CDR3 $\alpha$ - und CDR3 $\beta$ -Schleife relativ glatt. Die Längsachse der TCR-Interaktionsfläche verläuft zwischen den höchsten Punkten des MHC-Moleküls in einem Winkel von 20° – 30° zur pMHC-Längsachse (diagonale Orientierung). CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  liegen über dem N-terminalen Ende des im peptidbindenden Spalt des H-2K<sup>b</sup> liegenden Peptids, CDR1 $\beta$  und CDR2 $\beta$  liegen über dem C-terminalen Peptidende, und CDR3 $\alpha$  sowie CDR3 $\beta$ , die die stärksten Kontakte zum Peptid ausbilden, kommen über dem zentralen Peptidbereich zu liegen. Weiterhin tritt CDR1 $\alpha$  mit der N-terminalen Region der  $\alpha$ 1-Helix und CDR2 $\alpha$  mit der C-terminalen Region der  $\alpha$ 2-Helix des MHC-Moleküls in Kontakt. CDR2 $\beta$  interagiert mit dem C-terminalen Bereich der  $\alpha$ 1-Helix, CDR1 $\beta$  mit dem N-terminalen Bereich der  $\alpha$ 2-Helix des MHC-Moleküls. CDR3 $\alpha$  und CDR3 $\beta$  interagieren nicht direkt mit dem MHC-Molekül (Abb. 5).

1998 beschrieben Garcia et al. die Interaktion von 2C TCR und H-2K<sup>b</sup>/dEV8 noch detaillierter (Röntgenstrukturanalyse; 3,0 Å). CDR3 $\beta$  interagiert in diesem Modell nur minimal mit dEV8, die anderen 1996 beschriebenen Kontakte zwischen TCR CDR-Schleifen und pMHC werden bestätigt. Die Dissoziationskonstante (K<sub>d</sub>) beträgt 10<sup>-5</sup> M. Die Kontaktpunkte von CDR1 und CDR2 der  $\alpha$ -Kette sind strenger konserviert als die der  $\beta$ -Kette, was dafür spricht, daß es die TCR $\alpha$ -Kette ist, die die Orientierung des TCR während der Ligandenbindung vorgibt. Ein entscheidender Beitrag von CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  für die Festlegung der MHC-Klassenspezifität des TCR wurde vermutet (Sim et al., 1996). Die geringe Komplementarität von Selbst-Peptid und TCR-Bindungsfläche spricht für eine hohe Kreuzreaktivität des TCR und gegen eine ausschließliche Peptidspezifität der positiven Selektion (Garcia et al., 1998).

Abb. 4a



Abb. 4b

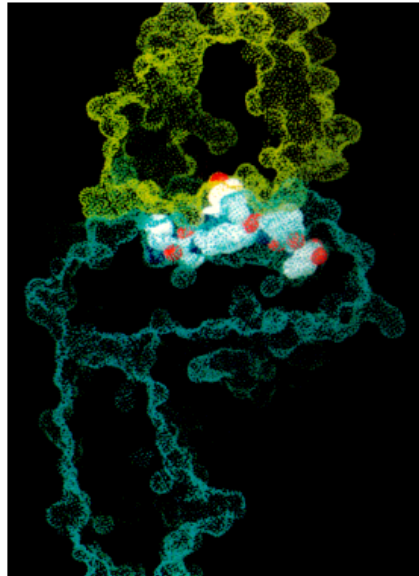


Abb. 4: Interaktion des A6  $\alpha\beta$ TCR mit Tax Peptid und HLA-A2 (Garboczi et al., 1996).

Abb. 4a: Die variablen TCR-Domänen ( $V\alpha$ : rot,  $V\beta$ :gelb) liegen diagonal über Tax Peptid (weiß) und dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2 (blau).

Abb. 4b: Lage des Tax Peptids (CPK Modell) zwischen A6 TCR (gelb) und HLA-A2 (blau).

Weitere Kristallstrukturen von  $\alpha\beta$ TCR, sowohl isoliert als auch im Komplex mit pMHC oder anti-TCR-Antikörpern, wurden seitdem beschrieben (Übersicht: Garcia et al., 1999). Die Komponenten des trimolekularen Komplexes lagen dabei als lösliche Proteine vor. Konformation und Orientierung eines MHC-Moleküls (H-2K<sup>b</sup>) auf einer künstlichen Zellmembran (Lipid-Monolayer mit Nickel) wurden kristallographisch erstmals 1999 analysiert (Celia et al., 1999).

Mit einer Röntgenstrukturanalyse beschrieben 1998 Ding et al. die Bindung des humanen B7  $\alpha\beta$ TCR an HLA-A2/Tax Peptid (2,5 Å). Dieser orientiert sich ebenfalls diagonal zum MHC-Molekül, ganz ähnlich wie der A6 TCR, benutzt jedoch ein anderes  $V\alpha$ -Segment. Die Kontakte zwischen CDR-Schleifen und pMHC zeigten eine sehr große Übereinstimmung mit dem Modell von Garboczi et al., 1996. CDR3 $\alpha$ , CDR3 $\beta$  und in zweiter Linie CDR1 $\alpha$  bilden die Peptidkontakte aus. Ding et al. fanden keinen Hinweis auf bindungsinduzierte Änderungen der TCR-Konformation, die zur konstanten Domäne des TCR übertragen werden und so an der Signaltransduktion beteiligt sein könnten.

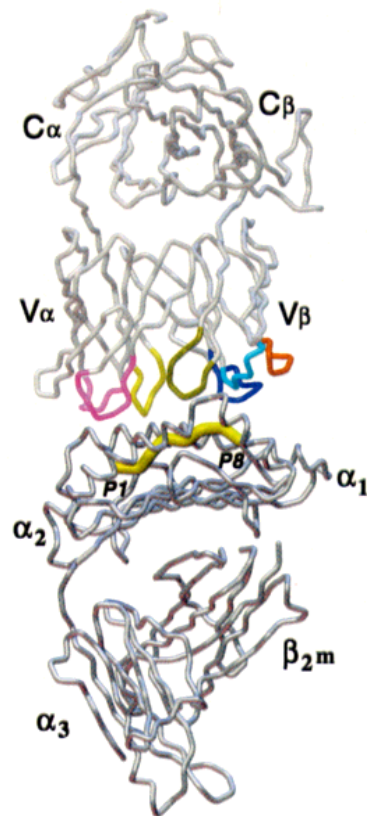


Abb. 5

Abb. 5: Interaktion des 2C  $\alpha\beta$ TCR mit H-2K<sup>b</sup>/Peptid (Garcia et al., 1996). Der 2C TCR liegt oben, CDR1 und CDR2 der  $\alpha$ -Kette sind pink dargestellt, CDR1 und CDR2 der  $\beta$ -Kette blau, CDR3 der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette gelb, hypervariable Region 4 (HV4) orange. Unten liegt das MHC-Klasse-I-Molekül H-2K<sup>b</sup> mit dem Oktamer-Peptid dEV8 (P1 – P8), dargestellt als gelbe Röhre. CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  liegen über der N-terminalen Peptidregion, CDR1 $\beta$  und CDR2 $\beta$  liegen über dem C-terminalen Peptidbereich und CDR3 $\alpha$  sowie CDR3 $\beta$  über dem zentralen Peptidbereich.

Teng et al. beschrieben 1998 die Kristallstruktur des N15  $\alpha\beta$ TCR im Komplex mit seinem MHC-Klasse-I-Peptid-Liganden (H-2K<sup>b</sup>/VSV8) bei 6 Å. Ebenso wie beim 2C TCR-H-2K<sup>b</sup>/dEV8 und beim A6 TCR-HLA-A2/Tax Komplex (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996), also bei TCR unterschiedlicher Spezifitäten und Arten, liegt die TCR V $\alpha$ -Domäne über der  $\alpha$ 2-Helix des MHC-Moleküls, und die TCR V $\beta$ -Domäne kommt über der  $\alpha$ 1-Helix des MHC-Moleküls zu liegen. CDR1 und CDR3 sind überwiegend an den Peptidkontakten beteiligt (CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ : N-terminaler Bereich, CDR1 $\beta$ , CDR3 $\beta$ : C-terminaler Bereich). CDR2 $\alpha$  und CDR2 $\beta$  interagieren vorwiegend mit dem MHC-Molekül.

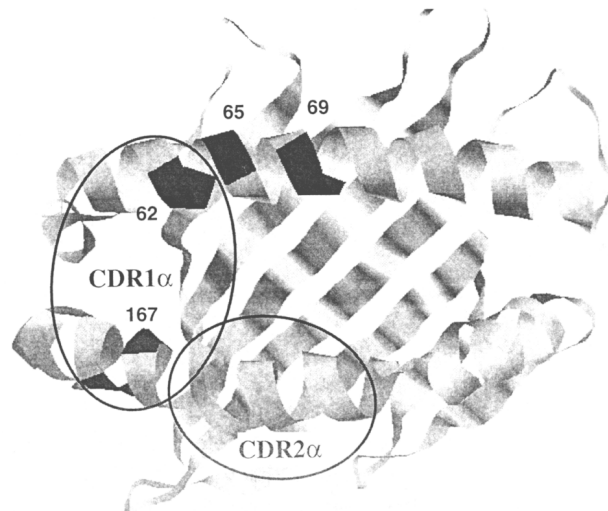


Abb. 6

Abb. 6: Das MHC-Molekül RT1A<sup>f</sup> der Ratte (Torres-Nagel et al., 2001). Kreise kennzeichnen Kontaktpunkte von CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  des TCR, basierend auf Röntgenstrukturanalysen von TCR/MHC-Komplexen (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996; Ding et al., 1998). Das Modell wurde mit bekannten MHC-Molekül-Koordinaten mit Swiss Model und RasMol erzeugt (www.expasy.ch und www.umass.edu/microbio). Dunkle Helixabschnitte: AS, die zum MHC-Molekül RT1A<sup>a</sup> differieren. Nummeriert: AS, die wichtige Kontakte zum TCR ausbilden (s. Diskussion).

Röntgenstrukturanalysen des A6 TCR in Komplex mit HLA-A2 und HTLV-1 Tax Peptid sowie drei weiteren Peptiden, die sich nur in jeweils einer Aminosäure vom Tax Peptid unterschieden, wiesen nicht darauf hin, daß sich die Struktur des  $\alpha\beta$ TCR bei Induktion unterschiedlicher T-Zellsignale veränderte (Degano et al., 1999). Die Peptide bewirkten schwache oder starke Affinität, wirkten als Agonist oder Antagonist. Lediglich minimale Verschiebungen im TCR-Peptid-Interaktionsbereich wurden beobachtet.

Die Röntgenstrukturanalyse des 2C TCR im Komplex mit H-2K<sup>b</sup> und dem „Superagonisten“-Peptid SIYR bei 2,8 Å zeigt, daß die CDR3-Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und CDR1 $\beta$  hauptsächlich an der Ausbildung zweier Taschenstrukturen beteiligt sind, in die die zentrale Peptidregion paßt, so daß sie als „functional hot spots“ bezeichnet werden (Degano et al., 2000).

Der Orientierungswinkel zwischen TCR und pMHC ist der Winkel zwischen einer durch die Zentren von TCR V $\alpha$  und V $\beta$  verlaufenden Gerade und einer zweiten Gerade, die durch das NH<sub>2</sub>-terminale und das COOH-terminale C $\alpha$ -Atom des MHC-I-präsentierten Peptids verläuft. Bei MHC-Klasse-II-Molekülen verläuft die zweite Gerade durch P1 und P9 des Peptids (Reinherz et al., 1999). Röntgenstrukturanalysen fanden bei MHC-

Klasse-I-Molekülen Orientierungswinkel zwischen  $45^\circ$  bis  $70^\circ$  („diagonale Orientierung“; Garboczi et al., 1996; Garcia et al., 1996 und 1998; Ding et al., 1998; Teng et al., 1998). Die diagonale Orientierung maximiert die TCR/pMHC-Interaktion und scheint durch konservierte strukturelle Eigenschaften von  $\alpha\beta$ TCR und MHC-Molekülen bedingt zu sein. Dennoch variieren die Positionen der TCR-Domänen und ihre Kontaktpunkte mit dem MHC-Molekül von Komplex zu Komplex. Die „footprints“ der TCR  $V\alpha$ -Domänen sind in den Röntgenstrukturanalysen der TCR/pMHC-Komplexe allerdings nahezu identisch, im Gegensatz zu denen der  $V\beta$ -Domänen. Insbesondere die CDR1 $\alpha$ - und CDR2 $\alpha$ -Positionen sind deckungsgleich zwischen den Komplexen. Die TCR  $V\alpha$ -Domäne scheint daher die steuernde Kraft zu sein, die die diagonalen Ausrichtung des TCR bei der Ligandenbindung bewirkt (Garcia et al., 1999).

Die erste Röntgenstrukturanalyse eines MHC-Klasse-II-Moleküls im Komplex mit Peptid (Conalbumin-Fragment; P1 - P16) und D10 TCR wurde 1999 bei  $3,2 \text{ \AA}$  von Reinherz et al. beschrieben. Die Peptidkontakte werden hauptsächlich durch  $V\alpha$  vermittelt (P1 – P8),  $V\alpha$  bindet ebenfalls an die  $\beta$ 1-Helix des MHC-Moleküls I-A<sup>k</sup>. Im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Komplexen orientiert sich der TCR orthogonal zum MHC-Klasse-II-Molekül, der Orientierungswinkel beträgt  $80^\circ$ . Diese unterschiedliche Orientierung könnte die Expression von CD4 und CD8 während der positiven Selektion beeinflussen und stützt somit das „instruction model“ (s. Kap. 1.5; Reinherz et al., 1999). Die nicht-polymorphen Korezeptoren CD4 und CD8 interagieren wahrscheinlich auf konservierte Weise mit dem TCR und pMHC (s. Kap. 1.4).

Die konservierten Helixbereiche der TCR/pMHC-Interaktionsfläche verstärken durch die Bereitstellung eines konservierten strukturellen Rahmens die Fähigkeit des TCR, viele verschiedene präsentierte Peptide zu screenen (Garcia et al., 1999). Die niedrige strukturelle Komplementarität kann die kurze Halbwertszeit der TCR/pMHC-Bindungen erklären, die einen wichtigen Parameter bei Selektion von Thymozyten und Aktivierung peripherer T-Zellen darstellt (Matsui et al., 1994; Nelson et al., 1994; Madrenas et al., 1997; „serial triggering“: Lanzavecchia, 1997; Lanzavecchia et al., 1999; Viola et al., 1997 und 1999; Ysern et al., 1998).

Konformationsänderungen der komplexen an der Signaltransduktion beteiligten Strukturen wurden bisher nur vereinzelt beobachtet (z. B. Veränderung der  $\alpha$ 3/ $\beta$ 2M-Paarung nach TCR-Bindung bei 2C TCR-H-2K<sup>b</sup>/dEV8: Garcia et al., 1998), und ihre

Bedeutung ist noch weitgehend unklar. Die Struktur des TCR ließe die Bildung von Dimeren zu (Fields et al., 1995; Reich et al., 1997), und *in vitro* konnte eine Dimer- (Garboczi et al., 1996) und Oligomerbildung (Boniface et al., 1995; Alam et al., 1999) von pMHC-gebundenen TCR nachgewiesen werden. Die Rate der TCR-Herunterregulation ist nicht direkt proportional zur TCR-Dichte sondern zum Quadrat dieser Dichte, was auf eine Formation von TCR-Dimeren oder -Trimeren hinweist. Mit der TCR-Oligomerbildung würde die Spezifität der T-Zellaktivierung zunehmen (Bachmann und Ohashi, 1999). Dennoch werden Modelle, die von einer TCR/pMHC-Dimerisation (oder Oligomerisation) ausgingen (Germain, 1993; Weiss, 1994; Stern et al., 1994; Fremont et al., 1996), durch Röntgenstrukturanalysen nicht gestützt.

Die Interaktion von TCR und MHC-Molekül kann das Erkennen von drei verschiedenen Strukturen beinhalten:

- I) Konservierte Strukturen, die allen MHC-Molekülen eigen sind
- II) MHC-klassenspezifische Strukturen
- III) MHC-allelspezifische Strukturen (polymorphe MHC-Strukturen einzelner Haplotypen)

Bei II) und III) sollten nach positiver und negativer Selektion im Thymus die TCR-Segmente, die die Interaktion mit dem MHC-Molekül vermitteln, ungleich in CD4- und CD8-Kompartimenten exprimiert werden. Am besten untersucht ist die Expression der TCR V-Segmente. Bei Mensch, Maus und Ratte wurden wiederholt ungleiche Verteilungen von V-Segmenten bei CD4 und CD8 T-Zellen beschrieben, z. B. exprimieren mehr CD4 als CD8 T-Zellen der Maus  $V\alpha 3.1$ , während  $V\alpha 3.2$  vorwiegend von CD8 T-Zellen exprimiert wird (Sim et al., 1996). Mit einem TCR transgenen Mausmodell wurde weiterhin gezeigt, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure entweder in CDR1 $\alpha$  oder CDR2 $\alpha$  von  $V\alpha 3.1$  bewirkt, daß  $V\alpha 3.1+$  TCR nicht mehr bevorzugt im CD4-, sondern im CD8-Kompartiment exprimiert werden und daß dies unabhängig von der jeweils koexprimierten V $\beta$ -Kette geschieht (Sim et al., 1996). Dies demonstriert eindrücklich die Bedeutung von TCR V $\alpha$  für die Festlegung der MHC-Klassenspezifität, am wahrscheinlichsten vermittelt durch Interaktion mit konservierten MHC-klassenspezifischen Epitopen. Segregationsanalysen zeigten ferner eine Kopplung von CD4/CD8-Quotient und TCR $\alpha$ -Locus bei der Maus (Sim et al., 1998).



H-2K<sup>K</sup> „überselektioniert“ V $\beta$ 2+ CD8 T-Zellen aufgrund eines MHC-allelspezifischen Beitrags (Tomonari, 1992). Zwei funktionelle Allele des V $\beta$ 13.1-Gens der Ratte sind bekannt (BV13S1A1: LEW, BUF, PVG; BV13S1A2: BN, WF). Die Genprodukte differieren in sechs Aminosäuren, von denen zwei in der CDR1 $\beta$ - und eine in der CDR2 $\beta$ -Schleife liegen. BV13S1A1 wird im CD4-Kompartiment überrepräsentiert, BV13S1A2 im CD8-Kompartiment (Stienekemeier et al., 2000). Es wurden viele weitere Hinweise dafür erbracht, daß der Erkennung MHC-klassenspezifischer und Haplotyp-spezifischer Determinanten durch TCR V-Segmente bei positiver und negativer Selektion im Thymus ein wichtiger Beitrag zukommt (Garman et al., 1986; MacDonald et al., 1988 und 1993; Blackman et al., 1989; Rodewald et al., 1989; Utsunomiya et al., 1989; Jameson et al., 1990; DerSimonian et al., 1991; Pircher et al., 1992; Goss et al., 1993; Tomonari et al., 1993; Herrmann et al., 1999; Sim et al., 1999; s. Diskussion).

Die stärkste bisher beschriebene „Überselektion“ eines TCR V-Segments im Thymus ist die RT1f-abhängige Überselektion von V $\alpha$ 8+ (mAk G177+) CD8 T-Zellen bei der Ratte. Periphere CD8 T-Zellen der LEW.1F Ratte (MHC-Haplotyp f) benutzen in 14,0% das Segment V $\alpha$ 8, periphere LEW.1F CD4 T-Zellen nur in 1,3%. Bei sieben verschiedenen RT1f-negativen MHC-kongeneten Lewis-Rattenstämmen (MHC-Haplotypen 1, a, c, d, k, n und u) sind nur 0,8-2,4% der peripheren CD8 T-Zellen mAk G177+ (Torres-Nagel et al., 1994). Während das Verhältnis von mAk G177+ CD8 T-Zellen zu mAk G177+ CD4 T-Zellen bei den RT1f-negativen Stämmen nur zwei bis drei beträgt, beträgt es bei der LEW.1F Ratte 10. Parallel dazu führt die Stimulation von CD8 T-Zellen RT1f-negativer Rattenstämme (LEW und LEW.1A) mit RT1A<sup>f</sup>+ DC, jedoch nicht mit RT1A<sup>a</sup>+ DC, zu einer ca. dreifachen Zunahme von mAk G177+ CD8 T-Zellen von 2,0% auf 6,4% innerhalb der polyklonalen Population von allostimulierten Blasten (Torres-Nagel et al., 1994).

Der Kontakt von V $\alpha$ 8 und RT1A<sup>f</sup> vermittelt somit sowohl positive Selektion im Thymus als auch Alloreaktivität von CD8 T-Zellen. Jedoch ist nach dem „differential-avidity model“ der TCR-vermittelten Antigenerkennung zur Aktivierung reifer T-Zellen eine höhere Avidität T-Zelle/APC erforderlich als zur positiven thymischen Selektion, die entweder durch eine höhere Ligandendichte oder eine höhere intrinsische Affinität zwischen TCR und pMHC erzielt werden kann (s. Kap. 1.5).

## 1.7 Aufgabenstellung

Der Kontakt eines TCR-Segments, nämlich der  $V\alpha 8$ -Kette, mit einem bestimmten MHC-Klasse-I-Molekül ( $RT1A^f$ ) vermittelt sowohl Alloreaktivität von peripheren  $V\alpha 8^+$  CD8 T-Zellen der LEW Ratte ( $RT11^+$ ) als auch positive Selektion von  $V\alpha 8^+$  CD8 T-Zellen im Thymus des MHC-kongeneten  $RT1f^+$  Rattenstammes LEW.1F (Torres-Nagel et al., 1994; s. Kap. 1.6). T-Zellaktivierung durch allogene MHC-Moleküle erfordert eine wesentlich höhere Avidität zwischen T-Zelle und APC als positive Selektion, zu der sowohl eine höhere intrinsische Affinität zwischen TCR und pMHC als auch eine höhere Ligandendichte beitragen können („differential-avidity model“: Ashton-Rickardt und Tonegawa, 1994). Vorausgesagt und auch für retrovirale Superantigene bei der Maus beschrieben (Herman et al., 1991; Liao und Raulet, 1992) wurde bisher nur die gleichzeitige Vermittlung von Alloreaktivität und negativer Selektion durch dasselbe TCR-Segment. Negative Selektion tritt ein, wenn die Avidität zwischen unreifer T-Zelle und APC einen Schwellenwert überschreitet, der noch unter dem zur Aktivierung reifer peripherer T-Zellen erforderlichen Schwellenwert liegt, und dient damit der Vernichtung potentiell autoreaktiver T-Zellen.

Zum Verständnis der Bedeutung des TCR  $V\alpha 8$ -Segments bei positiver Selektion und Alloreaktivität sollten die variablen Domänen der TCR  $\alpha$ -Ketten von  $RT1f$ -alloreaktiven  $V\alpha 8^+$  LEW CD8 T-Zellen ( $RT1f$ -spezifisch in einer gemischten Lymphozytenreaktion expandiert) auf Nukleotidebene analysiert und verglichen werden mit TCR von 1.)  $V\alpha 8^+$  ( $G177^+$ ) LEW.1F CD8 T-Zellen ( $RT1f$ -spezifisch im Thymus positiv selektioniert) und 2.) nicht allogenen stimulierten  $V\alpha 8^+$  ( $G177^+$ ) LEW CD8 T-Zellen. Darüberhinaus sollten neue TCR  $J\alpha$ -Gensegmente identifiziert werden und in die Analyse eingehen.

Folgende Fragestellungen waren insbesondere von Interesse:

- Werden  $RT1f$ -spezifische Alloreaktivität und positive Selektion von unterschiedlichen TCR  $V\alpha 8$ -Familienmitgliedern vermittelt?
- Wird die basale Affinität des TCR  $V\alpha 8$ -Segments durch bestimmte strukturelle Eigenschaften (Länge, Motive, Flexibilität, Anzahl von N-Nukleotiden) weiterer TCR-Komponenten ( $CDR3\alpha$ -Schleifen,  $J\alpha$ -Segmente) modifiziert?
- Existieren  $V\beta$ -Segmente, die durch bevorzugte Paarung mit dem TCR  $V\alpha 8$ -Segment einen Beitrag zu Alloreaktivität und positiver Selektion leisten?

## 2 MATERIAL

### 2.1 Puffer, Medien und Lösungen

BSS (balanced salt solution)	1 Vol BSS I; 1 Vol BSS II; 8 Vol aqua destillata
BSS I:	10 g Glucose; 0,6 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 g Phenolrot; aqua destillata ad 1 l
BSS II:	1,86 g $\text{CaCl}_2$ ; 4 g $\text{KCl}$ ; 80 g $\text{NaCl}$ ; 2 g $\text{MgCl}_2$ ; 2 g $\text{MgSO}_4$ ; aqua destillata ad 1 l
BSS/BSA	BSS mit 0,2% BSA
BSS/FCS	BSS mit 5% FCS
50 x Denhardts-Lösung	1% Ficoll 400; 1% Polyvinylpyrrolidon; 1% BSA
FCS	Inaktivierung der Komplementfaktoren durch 30 min Inkubation bei 56°C
GTE-Puffer	50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl (pH 8); 10 mM EDTA (pH 8)
<u>Hybridisierung</u>	
Hybridisierungslösung	10 ml Prähybridisierungslösung; 10 µl Hybridisierungsansatz: 30 µC $^{32}\text{P}$ -ATP; 2 µl 5 x Kinase-Puffer; 20 U T4-Polynukleotid-Kinase; 100-200 ng $V_{\alpha 8}$ Primer 26,9 µM; 100-200 ng $C_{\alpha}$ Primer 32,2 µM
Neutralisationspuffer 1	0,2 M Tris (pH 7,5); 1 M $\text{NaCl}$
Neutralisationspuffer 2	0,5 N $\text{NaCl}$ ; 0,05 N EDTA;

	25 mM NaPO <sub>4</sub> ; pH 8 einstellen
Waschlösung	1 x SSC; 0,1% SDS
Kulturmedium + IL-2	RPMI 1640; IL-2: 200 U/ml
10 x Ladepuffer	0,4% Bromphenol blau; 0,4% Xylencyanol FF; 50% Glycerin in H <sub>2</sub> O
LB (Luria-Bertani)-Ampicillin-Medium	20 g LB Medium; 50 mg Ampicillin; H <sub>2</sub> O ad 1 l
LB-Ampicillin-Agar-Medium	20 g LB Medium; 12 g Agar-Agar; 50 mg Ampicillin; 1 l H <sub>2</sub> O
Metrizamid-Lösung	14,5 g Metrizamid; 100 ml RPMI 1640; 10% FCS
PBS (phosphate buffered saline)	0,2 g KCl; 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,05 g MgCl <sub>2</sub> ; 8 g NaCl; 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; aqua destillata ad 1 l
PBS/BSA/Azid (FACS-Puffer)	PBS mit 0,1% BSA und 0,05% NaN <sub>3</sub>
<u>Plasmidisolutionspuffer</u>	
P1	1,211 g Tris; 0,744 g EDTA; 200 ml H <sub>2</sub> O; 100 µg/ml RNase A; pH 8 einstellen
P2	1,6 g NaOH; 190 ml H <sub>2</sub> O; 10 ml 20% SDS
P3	58,89 g K-Acetat; 180 ml H <sub>2</sub> O; 22 ml Eisessig; pH 5,5 einstellen
QBT	8,77 g NaCl; 2,09 g MOPS; 160 ml H <sub>2</sub> O; pH 7 einstellen; 30 ml Ethanol 98%; 3 ml 10% Triton X-100; H <sub>2</sub> O ad 200 ml
QC	29,22 g NaCl; 5,23 g MOPS; 400 ml H <sub>2</sub> O; pH 7 einstellen; 75 ml Ethanol 98%; H <sub>2</sub> O ad 500 ml
QF	14,61 g NaCl; 1,21 g Tris; 170 ml H <sub>2</sub> O; 30 ml Ethanol 98%; pH 8,5 einstellen

Prähybridisierungslösung	5 x SSC; 2 x Denhardt Lösung; 0,2% SDS; 100 µg/ml Heringssperma-DNA Heringssperma-DNA wurde mittels mehrmaliger Passage einer Kanüle in aqua destillata gelöst. Denaturierung: 15 min 70°C, gefolgt von raschem Abkühlen auf 4°C
RNA Puffer A	10 mM HEPES (pH 7,9); 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA
RNA Puffer B	10 mM Tris (pH 7,5); 7 M Harnstoff; 1% SDS; 0,3 M Natriumacetat; 20 mM EDTA
Dutch modified RPMI-Medium SC (supplement complete)	80 ml SC; 50 ml FCS; RPMI 1640 ad 1 l 500 ml FCS; 100 ml Natriumpyruvat; 100 ml nicht-essentielle Aminosäuren; 100 ml Pen-Strep; 5 ml β-Mercapto- Ethanol; 2,92 g Glutamin
SOB	20 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 0,55 g NaCl; 0,19 g KCl; H <sub>2</sub> O ad 1 l; pH 7 einstellen; autoklavieren
SOC	1 l SOB; 10 ml 2 M Glukoselösung (steril filtriert); 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung
20 x SSC (sodium salt citrat)	175,3 g NaCl; 88,2 g NaCitrat; 800 ml H <sub>2</sub> O
50 x TAE-Puffer	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
10 x TBE-Puffer	108 g Tris; 55 g Borsäure; 20 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8);

TENS	1 mM EDTA (pH 8) 50 mM Tris (pH 8); 100 mM EDTA (pH 8); 100 mM NaCl; 1% SDS
Trypanblau	0,04% in PBS mit 0,05% NaN <sub>3</sub>

## 2.2 Standards und Kits

### 2.2.1 Kits

ABI PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA Polymerase, FS	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Jetsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™Preamplifikationssystem	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
T7 Sequencing™Kit	Pharmacia, Freiburg

### 2.2.2 DNA-Molekulargewichtsmarker

λ/ EcoR I, Hind III-Marker

bp: 21200; 4970; 4280; 3530; 2030; 1900; 1580; 1330; 980; 830; 560; 130

Boehringer Mannheim, Mannheim

φX 174/ Hae III-Marker

bp: 1353; 1078; 872; 603; 310; 271; 234; 194; 118; 72

Promega, Mannheim

### 2.2.3 Radioaktive Substanzen

α (<sup>35</sup>S) dATP ; <sup>32</sup>P-ATP

Amersham, Braunschweig

## 2.3 Geräte

Autoklav „Selektomat S 2000“	MM, München
Bakterienschüttler „Certomat® R“	Braun AG, Frankfurt/Main
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osterode
FACS (Fluorescence-activated cell sorter) „Vantage cell sorter“	Becton Dickinson, San Jose, CA
Durchflußzytometer FACScan II	Becton Dickinson, Mountain View, CA
Gefrierschrank	Breda Scientific, Tilburg, Holland
Gelelektrophoreseapparatur, horizontal	institutseigene Werkstatt
Heizbad „M6 Lauda“	Dr. R. Wobster GmbH, Lauda-Königshofen
MACS™ (Magnetic activated cell sorter):	Miltenyi Biotec GmbH,
Zellseparator und -säulen	Bergisch-Gladbach
Magnetrührer	Bredon Scientific BV, Tilburg, Holland
Pipetten, einstellbare	Socorex, Renens, Schweiz; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
373A DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spannungsgeräte „Gene Power Supply GPS200/400“	Consort, Turnhout, Belgien; Pharmacia, Freiburg
Spektrophotometer	Beckman-DU, München
Sterilbank	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Thermocycler „DNA Thermal Cycler 480“	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT

## 2.4 Serologische Reagenzien

### Monoklonale Antikörper:

<b>mAk</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Referenz</b>
R73	Ratte $\alpha\beta$ TCR	Hünig et al., 1989
W3/25	Ratte CD4	Jefferies et al., 1985
OX35	Ratte CD4	Mason et al., 1980
341	Ratte CD8 $\beta$	Torres-Nagel et al., 1992
OX8	Ratte CD8 $\alpha$	Brideau et al., 1980
OX19	Ratte CD5	Mason et al., 1983 *)
G177	Ratte V $\alpha$ 8.2	Torres-Nagel et al., 1994
R78	Ratte V $\beta$ 8.2	Torres-Nagel et al., 1993
B73	Ratte V $\beta$ 8.5	Torres-Nagel et al., 1993
G101	Ratte V $\beta$ 10	Torres-Nagel et al., 1993
HIS42	Ratte V $\beta$ 16	Kampinga et al., 1989
V65	Ratte $\gamma\delta$ TCR	Kühnlein et al., 1994
L180	Schaf CD58	Hünig, 1985 **)

\*) CD5 (=Ly-1) wird exprimiert von peripheren  $\alpha\beta$ TCR+ und  $\gamma\delta$ TCR+ T-Zellen und Thymozyten der Ratte; nur dendritische epidermale T-Zellen (Elbe et al., 1995) und intraepitheliale intestinale T-Zellen (Kühnlein et al., 1994) sind CD5 negativ. Auch B-Zellen der Ratte exprimieren CD5, allerdings deutlich weniger als 10% (de Boer et al., 1992; Vermeer et al., 1994; Martin et al., 1996; Lee et al., 1999).

\*\*) CD58 (=LFA-3): Adhäsionsmolekül, das an CD2 z. B. auf T-Zellen bindet, eingesetzt als Negativkontrolle zur Feststellung unspezifischer Bindungen)

D $\alpha$ MIg-PE (Esel-anti-Maus-Ig, PE-konjugiert)	Dakopatts, Hamburg
NMIg (normales Maus-Ig)	Sigma, Deisenhofen
R $\alpha$ MIg (Kaninchen-anti-Maus-Ig)	AG Hünig
R $\alpha$ MIg-bio	AG Hünig



## 2.5 Enzyme

### Restriktionsenzyme

BssH II und Puffer	Boehringer Mannheim, Mannheim
EcoR I und Puffer	Boehringer Mannheim, Mannheim
Hae III und Puffer	Promega, Mannheim
EcoR V (20 U/μl) und Puffer	New England Biolabs, Schwalbach
HIND III (10 U/μl) und Puffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Ligase (3 U/μl) und Puffer	Promega, Madison, WI
Proteinase K (10 mg/ml)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Reverse Transkriptase („SuperScript RT“) und Erststrangpuffer	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
RNase A (Ribonuclease A)	Sigma, Deisenhofen
RNasin (RNase-Inhibitor; 40 U/μl)	Promega, Madison, WI
SAP (Shrimp alkalische Phosphatase; 1 U/μl)	USB/Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Polymerase (6 U/μl) und Puffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polynukleotidkinase (10 U/μl) und Puffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq Polymerase und Puffer	Promega, Madison, WI

## 2.6 Vektor

pBluescript® II KS+/- Plasmid-Vektor	Stratagene, Heidelberg
Genbank® # X52327 [KS(+)] & # X52329 [KS(-)]	

## 2.7 Bakterien

Epicurian Coli®XL-1Blue MRF<sup>+</sup> competent cells                      Stratagene, Heidelberg  
(Effizienz: > 1x10<sup>9</sup> cfu/μg pUC18 DNA)

## 2.8 Primer

Alle Primer wurden von Roth, Karlsruhe, bezogen, sofern nicht anders vermerkt.

### I) β-Aktin Primer (Ratte und Mensch)

*sense-Primer:*                      5' CTA ACG GCA ATG AGC GGT TC 3'

*antisense-Primer:*                5' CTT AGG AGT TGG GGG TGG CT 3'

Annealing-Temperaturen: 54°C

### II) TCR V $\alpha$ 8- und C $\alpha$ -spezifische Primer

*sense-Primer:*

V $\alpha$ 8-Primer:                      5' GGA GAC TCC GTG ACT CA 3'

CCC-Primer:                      5' TCG AGG TCG ACG GTA TC 3'

Sal 166-Primer:                  5' GGG TCG ACA GAA GGC CTG GTC AGT CT 3'

Der V $\alpha$ 8-Primer ist spezifisch für alle bekannten TCR V $\alpha$ 8-Familienmitglieder der Ratte, Sal 166 ist spezifisch für TCR V $\alpha$ 8.2 der Ratte (Giegerich et al., 1995). Der CCC-Primer ist spezifisch für TCR C $\alpha$  (Ratte) (Torres-Nagel, unpubliziert).

*antisense-Primer:*

C $\alpha$ -Primer:                      5' GGC TCT GGG TCT GTG ACA 3'

NOR-Primer:                      5' CTT AAG GAC GTC GGG CCC CC 3'

Hepta-Primer:                    5' GCA GTC TCC CTC ACT GTG 3'

Nona-Primer:                    5' GGT TCA TGT GCA GCT TCC 3'

Der C $\alpha$ -Primer ist spezifisch für TCR C $\alpha$  (Ratte), der NOR-Primer für TCR V $\alpha$ 8 (Ratte) (Torres-Nagel, unpubliziert). Hepta- und Nona-Primer wurden komplementär zu konservierten genomischen Heptamer- bzw. Nonamer-Rekombinationssignalsequenzen

und anschließenden Spacer-Sequenzen der TCR der Maus hergestellt (Holman et al., 1993).

Annealing-Temperaturen:

V<sub>α8</sub>-Primer und C<sub>α</sub>-Primer: 54°C (PCR-Primer)

Hepta, Nona und Sal 166: 60°C (PCR-Primer)

NOR: 63°C; CCC: 61°C (Sequenzierungsprimer)

### III) TCR Vβ- und Cβ-spezifische Primer

Diese Primer wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Giegerich, Neurologische Universitätsklinik, Würzburg, zur Verfügung gestellt (Gold et al., 1995).

*sense-Primer:*

Vβ1	5'	ACC	TTC	AGG	ATT	CTT	CTC	T	3'
Vβ2		TGG	CAG	TTT	TGC	ATT	CTG	T	
Vβ3		GAT	TGC	CAA	GTT	ATC	CAA	ACT	C
Vβ4		GAC	CCT	AAA	ATT	ATC	CAG	AAA	C
Vβ5		ATT	CTG	GGG	TGG	TCC	AGT	C	
Vβ6		GGT	GGT	GCC	ATT	ACT	CAG	AC	
Vβ7		GAC	ATG	AAT	GTA	ACA	CAG	ATG	C
Vβ8.1		GAG	GCT	GCA	GTC	ACC	CAA	AG	
Vβ8.2		AAA	CAC	ATG	GAA	GCT	GCA	GTC	
Vβ9		GAT	ACA	ATG	GTT	ATG	CAG	AAC	C
Vβ10		GAG	ACG	GCT	GTT	TTC	CAG	ACT	
Vβ11		AAT	GCT	GGT	GTC	CAT	CCA	AAC	AC
Vβ12		GAT	GCT	GGA	GTC	ACC	CAG	A	
Vβ13		GAA	ACT	GGA	GTC	CAG	TC		
Vβ14		GCT	CAG	ACT	ATC	CAT	CAA	TGG	
Vβ15		GGA	GCT	CTC	GTC	CAC	CAA	TC	
Vβ16		GGA	CCC	AAC	GTC	CAA	CAG	AT	
Vβ17		GTT	GCT	GAA	GTA	ACC	CAG	CAT	
Vβ18		AGT	GTC	TTC	CTC	TAC	CAA	AAG	C

Vβ19        GAT TGC TGC TGT TAT TCA GAC G  
 Vβ20        CGA AGA CTA CCG AGT TTG TT

*antisense-Primer:*

Cβ        5' GTG GAG TCA CCG TTT TCA GAT C 3'

Annealing-Temperaturen:

55°C: Vβ4

57°C: Vβ1-Vβ3, Vβ5-Vβ7, Vβ8.2, Vβ9, Vβ12- Vβ14, Vβ16, Vβ17, Vβ20

59°C: Vβ8.1, Vβ10, Vβ11, Vβ15, Vβ18, Vβ19

## 2.9 Versuchstiere

Für die Gewinnung von Milz und Lymphknoten wurden 4-12 Wochen alte weibliche LEW und LEW.1F Ratten aus institutseigener Zucht verwendet.

## 2.10 Software

FACScan-Analysen	Cell Quest Software, Becton Dickinson, San Jose, CA
Translationen	Mac Vector, International Biotechnologies, New Haven, CT
Densitometrie	WinCam Version 1.0, Cybertech, Berlin
Multiple DNA-Alignment	MALIGNED, Sequence Navigator™ Version 1.0.1, ABI PRISM, Perkin Elmer, Norwalk, CT (Clark, 1992)
Peptid-Alignment	CLUSTAL W (Thompson et al., 1994); Genetic Data Environment editor, S. Smith, Harvard University

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Zellisolierung aus Lymphknoten und Milz

##### 3.1.1.1 Isolierung von Lymphknotenzellen

4 bis 12 Wochen alten LEW Ratten wurden nach Tötung durch CO<sub>2</sub>-Begasung mit Trockeneis unter sterilen Bedingungen zervikale, axilläre, inguinale, submandibuläre sowie mesenteriale Lymphknoten entnommen. Die Lymphknoten wurden in BSS-Medium aufgenommen und zur Herstellung einer Suspension nach Abtrennung von eventuell vorhandenen Fett- und Geweberesten durch ein Metallsieb gerieben, das in einer mit BSS-Medium gefüllten Petrischale lag.

Zur Entfernung von Zellklumpen wurde die Suspension in einem ZFR (15 ml) 5 - 10 min bei 0°C inkubiert. Der Überstand wurde zentrifugiert (1500 Upm, 5 min), und das so erhaltene Pellet wurde in 1 ml BSS-Medium aufgenommen. So wurden 1 - 3 x 10<sup>8</sup> Lymphknotenzellen (LK-Zellen) einer Ratte isoliert.

##### 3.1.1.2 Isolierung dendritischer Zellen der Milz

4 bis 12 Wochen alte LEW.1F Ratten wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Die folgende Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Rattenmilz wurde in eine Petrischale mit 5 ml Dutch-RPMI-Medium überführt. Durch Quetschung der Milz mittels des Griffes einer 10 ml Spritze wurde eine Zellsuspension hergestellt. Diese Suspension wurde in ein ZFR (15 ml) überführt, das nach Auffüllung mit Dutch-RPMI-Medium 10 min bei 0°C inkubiert wurde. Nach dem Absetzen von Geweberesten wurde der Überstand in einem zweiten ZFR bei Raumtemperatur (RT) und 1300 Upm 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 7 ml Dutch-RPMI-Medium resuspendiert und über Nacht in

Kultur genommen (37°C). Dabei adhärirten Makrophagen und Fibroblasten an der Wand der Kulturflasche.

Um die Konzentration der dendritischen Zellen (DC) der Milz von ca. 1% auf 30 - 50% zu steigern, wurde die Suspension am nächsten Tag erneut in ein ZFR überführt. Nach Zugabe von 2 ml Metrizamid (Macatonia et al., 1987) wurde 10 min bei 2100 Upm und RT zentrifugiert (keine Bremse), wobei sich eine Interphase ausbildete, in der sich die DC konzentrierten und welche mit einer Pipette isoliert wurde. Nach wiederholter Zentrifugation der Zellen der Interphase (2000 Upm, 5 min, in 15 ml Dutch-RPMI-Medium) wurde das Pellet in 1,8 ml Dutch-RPMI-Medium aufgenommen, und die so gewonnene Suspension wurde mit 3500 rad bestrahlt und anschließend einmal gewaschen. So wurden pro Milz ca.  $1,5 \times 10^6$  dendritische Zellen isoliert.

### 3.1.1.3 Bestrahlung von Zellen

Durch die Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen verhindert die Bestrahlung die Proliferation von Zellen. Bestrahlt wurden diejenigen Zellen, die später als Stimulatorzellen in eine MLR eingesetzt wurden (s. Kap. 3.1.7). Zur Bestrahlung wurden Zellen in Dutch-RPMI-Medium in einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und in Kryoröhrchen (1,8 ml) mit Schraubverschluß gegeben. Die Bestrahlung erfolgte mit 3500 rad (35 Gray), die Zellen waren dabei auf 0°C gekühlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen zweimal mit Dutch-RPMI-Medium gewaschen, um entstandene Radikale zu entfernen.

### 3.1.2 Nylonwollfiltration: Trennverfahren zur Anreicherung von T-Zellen

Die Nylonwollpassage einer Lymphknotenzellsuspension stellt eine effektive Maßnahme dar, T-Zellen anzureichern (Mishell und Shiigi, 1980). Dabei macht man sich das unterschiedliche Adhärenzverhalten der Lymphknotenzellen (LK-Zellen) an Nylonfasern zunutze. B-Zellen, Makrophagen und andere akzessorische Zellen adhärirten stärker als T-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die Konzentration der T-Zellen läßt sich mit diesem Verfahren von ca. 70% auf 80 – 90% steigern, abhängig ist die

Effektivität dabei von Menge und Dichte der Nylonwolle, Elutionsgeschwindigkeit und -volumen, Inkubationstemperatur und -dauer. Durch die Nylonwollfiltration werden ca. 90% der B-Zellen und 35% der T-Zellen verloren (Hoffmeyer, 1994).

3 g Nylonwolle wurden per Hand zu einem Volumen von 40 bis 50 ml aufgefasernt und locker in eine 60 ml Einwegspritze mit Silikonschlauch und Quetschhahn an der Schlauchspitze gegeben. Die Nylonwollsäulen wurden autoklaviert und anschließend möglichst luftblasenfrei mit dem dreifachen Säulenvolumen BSS gewaschen. Nun wurden die Säulen mit 50 ml BSS + 5% FCS-Medium äquilibriert und 45 min bei 37°C erwärmt. Die LK-Zellsuspension wurde ebenfalls in auf 37°C temperiertes BSS + 5% FCS-Medium aufgenommen (Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml Medium) und auf die Nylonwolle gegeben, in die sie hineinsickerte. Die Kapazität einer Nylonwollsäule (60 ml) beträgt  $1 \times 10^8$  bis  $5 \times 10^8$  Zellen. So wurden die Säulen zur Adhärenz von B-Zellen und akzessorischen Zellen 45 min bei 37°C inkubiert. Die nicht-adhären Zellen wurden anschließend mit 50 ml BSS/FCS-Medium (37°C) mit  $v = 1$  ml Medium/min eluiert und einmal mit BSS/FCS gewaschen.

### 3.1.3 Magnetic activated cell sorter (MACS®): Immunmagnetisches Trennverfahren zur Depletion von B-Zellen und CD4+ T-Zellen

#### 3.1.3.1 Immunmagnetische Markierung für den MACS®

Nach der Nylonwollpassage wurden die gereinigten LK-Zellen ( $n=10^8$ ) in 10 ml BSS/BSA-Medium aufgenommen. In sättigender Konzentration wurden die mAk W3/25 und Ox35 (beide CD4 spezifisch) zugegeben. Die Zellen wurden 20 - 25 min bei 4°C inkubiert, dreimal mit BSS/BSA-Medium gewaschen und erneut auf eine Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml eingestellt. Nun wurde in sättigender Konzentration biotinyliertes R $\alpha$ MIg zu der Suspension gegeben, und es folgte eine Inkubation über 20 - 30 min bei 4°C. Währenddessen reagierte R $\alpha$ MIg-bio sowohl mit W3/25 und Ox35 als auch mit B-Zellen (hohe Kreuzreaktivität von R $\alpha$ MIg mit Ratten-Ig) und Makrophagen (Fc-Rezeptoren).

Nach der Inkubation wurde dreimal mit BSS gewaschen, und die Zellen wurden in 1 ml BSS aufgenommen. Dann wurde mit  $100 \mu\text{l}$  Streptavidin-beads/ $10^8$  Zellen (Streptavidin-beads: Streptavidin-konjugierte mikromagnetische Partikel) inkubiert (15 min,  $40^\circ\text{C}$ ). Das aus Streptokokken stammende Streptavidin, das vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt, sättigte dabei die Biotinbindungsstellen des R $\alpha$ Mig-bio. CD4+ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen waren somit immunmagnetisch markiert. Nach einmaligem Waschen (BSS) durchlief die Zellsuspension das Magnetfeld des MACS<sup>®</sup>.

### 3.1.3.2 MACS<sup>®</sup>: magnetisch aktivierter Zellsort

Hauptbestandteile der Apparatur zur Zellseparation sind eine mit Stahlwolle engmaschig gefüllte, vertikal fixierte Säule und eine Vorrichtung zur Anlegung eines Magnetfelds um diese Säule. Die Flußgeschwindigkeit durch den Zellsorter wurde mit der Auswahl der an das Säulenende aufgesetzten Kanüle reguliert (20G: 6 ml/min; 22G: 1,5 ml/min).

Bei der negativen Selektion werden immunmagnetisch markierte Zellen aufgrund des Magnetfeldes in der Säule zurückgehalten und so von der zu isolierenden Zellpopulation getrennt. Ebenfalls möglich ist die positive Selektion: die zu isolierende Population wird markiert, die markierten Zellen werden eluiert, und in einem folgenden Elutionsvorgang werden nach Ausschaltung des Magnetfeldes die markierten Zellen ausgewaschen und aufgefangen.

Die Säule des magnetischen Zellsorters (B2:  $10^8$  Zellen, Vol ca. 2,5 ml) wurde zuerst mit BSS, dann mit 2 - 3 Vol auf  $4^\circ\text{C}$  gekühltem BSS/BSA gewaschen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 6 ml/min.

Eine immunmagnetisch markierte Zellsuspension (s. Kap. 3.1.3.1) wurde nun auf die Säule pipettiert und nach Anlegung des Magnetfelds mit 10 ml ( $\cong$  ca. 4 Vol) BSS/BSA ausgewaschen (Flußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min). Dabei blieben B-Zellen und CD4+ T-Zellen aufgrund des Magnetfelds in der Säule zurück (Depletion), die CD8+ T-Zellen wurden in einem ZFR aufgefangen.

Die eluierten Zellen wurden zentrifugiert und in Kulturmedium + IL-2 (200 U/ml) aufgenommen.

Durch die MACS-Passage läßt sich die Konzentration CD8+ T-Zellen auf über 80% erhöhen (Miltenyi et al., 1990).



### 3.1.4 Lebendzellzahlbestimmung

Um die Anzahl lebender Zellen einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Suspension mit Trypanblaulösung verdünnt (z. B. 1 : 1, d. h. mit einem Verdünnungsfaktor  $v = 2$ ) und in eine Neubauerkammer (Tiefe: 0,1 mm, minimum counting square:  $0,0025 \text{ mm}^2$ ) pipettiert. Trypanblau färbt nur tote Zellen an, bei lebenden Zellen mit intakter Zellmembran ist es nicht membrangängig. Unter dem Mikroskop konnte die Lebendzellzahl bestimmt werden. In 16 Quadranten der Neubauerkammer sollten nicht weniger als 200 Zellen sein. Nach folgender Formel berechnet sich die Lebendzellzahl:

$$c = 10^4 n v$$

$c$  = Zellkonzentration; Einheit:  $\text{ml}^{-1}$ ;  $n$  = Zellzahl in 16 Quadranten (=  $0,1 \mu\text{l}$ );  
 $v$  = Verdünnungsfaktor (ohne Einheit)

### 3.1.5 Immunfluoreszenzanalyse im Durchflußzytometer (FACScan)

#### 3.1.5.1 Zellfärbungen für die Durchflußzytometrie

Färben bezeichnet die Markierung von Zellen durch direkte oder indirekte Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAk an Zelloberflächenantigene.

Folgende Fluoreszenzfarbstoffe standen zur Auswahl:

Fl. 1 : FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) (grün)

Fl. 2 : PE (Phycoerythrin) (orange)

Fl. 3 : RED670 (rot)

Die Antikörper wurden in zuvor austitrierten sättigenden Konzentrationen eingesetzt. Die zu färbenden Zellen wurden zuerst einmal mit FACS-Puffer gewaschen (5 min, 2000 Upm) und in FACS-Puffer aufgenommen, wobei die Konzentration  $1 - 3 \times 10^6$  Zellen/ml FACS-Puffer betrug. Von dieser Suspension wurden zur Färbung  $100 \mu\text{l}$  in ein Polystyrolröhrchen (5 ml) überführt.

Einfachfärbungen (Färbungen nur eines Oberflächenantigens) erfolgten entweder direkt (in der Regel mit FITC-konjugiertem mAk) oder indirekt unter Verwendung biotinylierter mAk oder sekundärer Antikörper wie D $\alpha$ MIg-PE oder R $\alpha$ MIg-PE (spezifisch für unkonjugierte, oberflächenantigenspezifische mAk). Nach Zugabe des mAk zur Suspension im Polystyrolröhrchen wurde 20 min bei 4°C unter Lichtausschluß inkubiert. Bei der Verwendung biotinylierter mAk wurde nach dieser Inkubation zweimal mit 4 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 2000 Upm), um freies Biotin zu entfernen, bei nicht biotinylierten mAk war ein Waschvorgang zur Abtrennung ungebundener Antikörper ausreichend. Biotinylierte mAk wurden in einem zweiten Inkubationsschritt (20 min, 4°C, 1 Waschvorgang) durch Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertes Streptavidin gefärbt.

Bei Mehrfachfärbungen wurden indirekte Färbungen mittels D $\alpha$ MIg-PE, gefolgt von einer Inkubation mit NMIg zur Blockierung noch freier F<sub>C</sub>-Rezeptoren des D $\alpha$ MIg-PE, grundsätzlich vor direkten Färbungen durchgeführt. Färbungen mit biotinyliertem mAk erfolgten an letzter Stelle.

Als Negativkontrolle wurde als mAk irrelevanter Spezifität L180 verwendet (Spezifität: CD58 des Schafes).

### 3.1.5.2 Immunfluoreszenzanalyse (FACScan)

Mit dem FACScan<sup>®</sup> (Fluorescence-activated cell scanner, Durchflußzytometer) werden Zellen gezählt und gleichzeitig kann die Expression von bis zu drei Oberflächenantigenen, Größe und Granularität analysiert werden.

Zellen einer Zellsuspension werden einzeln durch einen Laserstrahl geschickt. Die Lichtstreuung im Winkel von 180° zum eingestrahnten Licht (forward scatter/FSC) korreliert mit der Zellgröße; im Winkel von 90° gemessenes Streulicht (side scatter/SSC) korreliert mit der Granularität der Zellen.

Zur Bestimmung der Emission von Fluoreszenzlicht (bei 90°) nach Anregung durch den Laser von maximal drei Farbstoffen gleichzeitig wurden Oberflächenantigene mit einem mAk markiert. Dabei handelte es sich entweder um einen direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper oder um einen unkonjugierten mAk, der

zuvor mit einem zweiten fluoreszenzgefärbten Antikörper markiert worden war (indirekte Färbung).

Aufgenommene Daten wurden mit Lysis II Software von Becton Dickinson ausgewertet. Die Darstellung erfolgte mit zweidimensionalen dot-plots, bei denen jeder Punkt einer Zelle entspricht (side scatter oder Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen forward scatter), oder mit Histogrammen (Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen Zellzahl). In der Regel wurden 5000 bis 10 000 lebende Zellen einer Probe analysiert, lebende Zellen ließen sich durch die Parameter Zellgröße und Granularität von toten Zellen unterscheiden.

### 3.1.6 FACS<sup>®</sup>: Fluoreszenzaktivierter Zellsorter

Mit dem FACS<sup>®</sup> können Zellen bezüglich der Expression von Oberflächenantigenen analysiert und gezählt werden und Subpopulationen eines Zellgemisches isoliert werden. Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen und der Fluoreszenznachweis durch Anregung mit einem Laserstrahl erfolgen ähnlich wie beim Durchflußzytometer. Der Zellsorter verändert jedoch nach Anweisung des Computers die elektrische Ladung derjenigen Tropfen (1 Zelle/Tropfen), in denen sich eine markierte Zelle befindet. Diese Tropfen werden durch ein elektrisches Feld aus dem Zellstrom abgelenkt, und damit werden markierte Zellen unmarkierten getrennt.

Folgendes Färbeschema wurde zur Markierung von Zellen vor dem fluoreszenzaktiviertem Zellsort angewandt:

$1,2 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml steril filtrierten FACS-Puffer aufgenommen. Nach Zusatz von biotinyliertem mAk G177 (in FACS-Puffer, steriles Filtrat, sättigende Konzentration) erfolgte eine 25-minütige Inkubation auf Eis, ein Waschvorgang, dann die Zugabe von Streptavidin-PE (in FACS-Puffer, steriles Filtrat, sättigende Konzentration). Nach einer 15-minütigen Inkubation und einem erneuten Waschvorgang standen die Zellen für den Zellsort bereit.

Nach dem Zellsort wurden die Zellen 2,5 Tage in PBS in Kultur genommen.

### 3.1.7 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Die MLR ist eine *in vitro* Nachweismethode der Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch Kultivierung von Zellen zweier histoinkompatibler Organismen. T-Zellen werden als „responder-Zellen“ zusammen mit stimulierenden Zellen kultiviert. Die stimulierenden Zellen werden zuvor bestrahlt, um einen Angriff auf die T-Zellen zu verhindern. Sie exprimieren allogene MHC-Moleküle, wodurch T-Zellen zu Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen angeregt werden.

Wir verwandten als stimulierende Zellen die bestrahlten Milzzellen von LEW.1F Ratten, angereichert an dendritischen Zellen (ca. 30 - 50% DC, s. Kap. 3.1.2), die das MHC-Klasse-I-Genprodukt RT1A<sup>f</sup> exprimieren. Als responder-Zellen wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten der LEW Ratte eingesetzt, welche mittels Nylonwollpassage und magnetischer CD4<sup>+</sup> T-Zell- und B-Zell-Depletion gereinigt worden waren (Reinheit: > 80%, s. Kap. 3.1.2 und 3.1.3). Die Zellen wurden in einer 96-Napfplatte mit Rundboden vier Tage im Brutschrank (37°C) kultiviert.

Dabei wurden die Zellen in folgenden Konzentrationen pro Napf (well) eingesetzt:

stimulierende Zellen:	10 <sup>4</sup> Zellen in 100 µl Dutch RPMI Medium
responder-Zellen:	10 <sup>5</sup> Zellen in 100 µl Kulturmedium + IL-2 (200 U/ml)

Im Abstand von 2 Tagen wurden erst 0,25 Vol, dann 0,5 Vol Kulturmedium + IL-2 (200 U/ml) zugegeben. Das IL-2 dient T-Zellen als Wachstumsfaktor; diese beginnen ca. 6 Stunden nach Antigenstimulation IL-2-Rezeptoren zu exprimieren.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese trennt Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen in einem elektrischen Feld auf. Die Gelmatrix wirkt als Molekularsieb, Porösität des Gels und Trennschärfe korrelieren. Für linearisierte DNA gilt, daß sich die durch das Phosphodiesterückgrat bedingte negative Ladungsmenge eines Moleküls direkt proportional zu seiner Länge und die Wanderungsgeschwindigkeit indirekt proportional zum Logarithmus der DNA-Länge verhält (pH 7). DNA-Fragmente der Größen 0,3 bis 3 kbp wurden über horizontale 1,5% Agarosegele aufgetrennt. Doppelsträngige lineare DNA-Moleküle diffundieren umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  der Anzahl der Basenpaare durch die Gelmatrix.

Es wurden 1,5% Agarose-TAE-Gele hergestellt, indem in entsprechendem Verhältnis Agarose in 1 x TAE gelöst und aufgeköcht wurde (1 l 1 x TAE, 15 g Agarose). Vor dem Erstarren des Gels wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch mit DNA-Basen, so daß diese unter UV-Licht schon in geringsten Mengen sichtbar werden. Das Gel polymerisierte bei 4°C innerhalb von ca. 20 min in einem Gelbett, in das luftblasenfrei ein Kamm zur Bildung der Probenaschen eingesetzt war.

Nach Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer transferiert, der Kamm entfernt. Als Elektrophoreselaufpuffer wurde 1 x TAE eingesetzt. Als Molekulargewichtsmarker wurden DNA-Fragmente definierter Größe ( $\phi\text{X 174}$  Phagen-DNA, geschnitten mit dem Restriktionsenzym Hae III, und DNA des Coliphagen  $\lambda$ , geschnitten mit HIND III und Eco RI) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 1/10 Vol Farbmaler (10 x Ladepuffer) versetzt. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  einer Probe in eine Tasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung zwischen 80 V und 90 V durchgeführt.

### 3.2.2 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurden Aliquots von Nukleinsäurelösungen verdünnt und die Absorption des Lichts der Wellenlängen 260 nm, 280 nm sowie 320 nm bestimmt.

Mithilfe der bei 260 nm ermittelten Absorption ( $=OD_{260}$ ) kann die Nukleinsäurekonzentration der Probe errechnet werden:  $OD_{260} = 1$  entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  Doppelstrang-DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  Einzelstrang-DNA oder RNA und einer Oligonukleotidkonzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Das Verhältnis  $OD_{260} : OD_{280}$  beschreibt die Nukleinsäureinheit. Es beträgt bei reinen RNA- und DNA-Präparationen 2,0 bzw. 1,8. Bei Verunreinigungen (z. B. durch Proteine oder Phenol) wird der Quotient kleiner. Der Streulichtfaktor  $OD_{320}$  beträgt idealerweise Null.

### 3.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus wässrigen DNA- oder RNA-Lösungen. Wenn nicht anders beschrieben, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25 : 24 : 1) im Verhältnis 1 : 1 zu der Nukleinsäurelösung gegeben. Es folgte heftiges Schütteln oder Vortexen und eine Zentrifugation für 10 min bei 15 000 Upm. Die Nukleinsäuren befanden sich danach in der oberen Aquaphase. Diese wurde mit einer Pipette in ein neues RG transferiert.

Anschließend wurden die Nukleinsäuren präzipitiert: 96% Ethanol (2 Vol bei DNA; 2,5 Vol bei RNA) vermag in Gegenwart von Salzen (1/10 Vol 3 M Natriumazetat) Nukleinsäure zu fällen; bei  $-20^{\circ}\text{C}$  dauert diese Reaktion ca. 2 Stunden, bei  $-70^{\circ}\text{C}$  nur 5 min. Die gefällte Nukleinsäure wurde dann pelletiert (15 000 Upm, 20 min). Es folgte ein Waschvorgang mit 70% Ethanol, danach eine Zentrifugation von 5 min bei 15 000 Upm. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes folgte die Lufttrocknung des Pellets und die anschließende Lösung in 10  $\mu\text{l}$  TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.2.4 Isolierung zytoplasmatischer RNA

Um die Aktivität ubiquitärer, stabiler RNasen zu minimieren, wurden folgende Vorkehrungen getroffen:

- Tragen von Einmalhandschuhen während des Umganges mit RNA und der Vorbereitung von Materialien und Lösungen für RNA-Analysen und -Präparationen; häufiges Wechseln der Handschuhe;
- gesondert aufbewahrtes Verbrauchsmaterial und Chemikalien, reserviert nur für das Arbeiten mit RNA;
- Lösungen wurden aus RNase freien Chemikalien und Wasser, dem 0,1% DEPC (potenter RNase-Inhibitor) zugesetzt wurde, hergestellt und nach 12 Stunden zur Zerstörung des DEPC autoklaviert;
- Vermeidung der Berührung der Pipettenspitzen;
- Vermeidung von Sprechen und heftigem Atmen;
- Ausführung aller Arbeitsschritte unter einer Temperatur von 4°C zur Herabsetzung der RNase-Aktivität;
- möglichst ausschließliche Verwendung von Plastikwaren; Glaswaren wurden nach dem Autoklavieren 24 Stunden bei 150°C trocken sterilisiert.

Zytoplasmatische RNA von Lymphknotenzellen wurde mit der NP-40 Methode isoliert, die von Gough 1988 beschrieben und von Schreiber et al. 1989 modifiziert wurde. Zellen werden dabei dem Detergenz NP-40 in einer genau auf Zellzahl und Zellgröße abgestimmten Konzentration ausgesetzt, so daß die Zellmembran, nicht aber die Kernhülle, lysiert wird. Intakte Kerne werden anschließend per Zentrifugation abgetrennt. Bis zu  $10^7$  Zellen (in PBS, zuvor Waschung mit PBS) wurden bei 14 000 Upm 15 sec in einer Mikrozentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 400 µl RNA Puffer A sorgsam resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis zur Förderung der Zellaufquellung wurden 20 µl 10% NP-40 Lösung zugegeben. Dann wurde 10 sec zur Lyse der Zellmembran gevortext und sofort danach zur Abtrennung von Kernen und unlysierten Zellen 30 sec bei 14 000 Upm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert.

Der RNA-haltige Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt, welches 400 µl RNA Puffer B und 600 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) zur Proteinentfernung enthielt. Sofort wurde sorgfältig gemischt (Proteinextraktion) und nach Zentrifugation über 5 min mit 1500 Upm (Mikrozentrifuge) entstanden zwei Phasen. Die Aquaphase wurde vorsichtig in ein neues RG überführt.

2,5 Vol 96% Ethanol wurden zugegeben. Das RG wurde gevortext und bei -20°C mindestens 12 Stunden aufbewahrt, um die vollständige RNA-Präzipitation zu gewährleisten. Die Reinheit der RNA-Präparation wurde mittels Spektralphotometrie ermittelt. Die RNA stand nun zur cDNA-Synthese bereit.

### 3.2.5 cDNA-Synthese

Mit Reverser Transkriptase läßt sich RNA in cDNA (complementary DNA, komplementäre DNA) umschreiben. Am 3' Ende der meisten eukaryontischen mRNA-Moleküle befindet sich eine Poly-A-Sequenz. Mit ihr paart sich der Oligo-dT-Primer.

Erststrang-cDNA wurde mit Hilfe des SuperScript™ Preamplifikationssystems (Gibco BRL GmbH, Eggenstein) zur Gesamt-RNA synthetisiert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C ausgeführt. Ca. 1 µg der in Ethanol vorliegenden RNA wurde 20 min bei 15 000 Upm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 23,5 µl 0,1% DEPC-Wasser aufgenommen. Zu dem Ansatz wurden gegeben:

4 µl	10 mM dNTP Mix (jeweils 2,5 mM )
2 µl	Oligo-dT-Primer (0,1 µg/µl)
8 µl	5 x Reverse Transkriptase Erststrangpuffer
1 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	RNAsin (40 U/µl; Promega)
0,5 µl	SuperScript Reverse Transkriptase (400 U/µl)



Dabei wurden die Reverse Transkriptase und der RNAsin jeweils zuletzt zugegeben. Der Ansatz von 40 µl wurde erst 10 min bei RT, dann 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Beendet wurde die Aktivität der Reversen Transkriptase durch eine 5-minütige Inkubation bei 95°C und unmittelbar anschließender Abkühlung auf Eis. Die Aufbewahrung der cDNA-Proben erfolgte bei –20°C.

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente um den Faktor  $10^9$  und höher. Ein PCR-Zyklus besteht aus Denaturierungsphase (Auftrennung des DNA-Doppelstrangs), Annealing-Phase (Hybridisierung von zwei spezifischen Oligonukleotiden, „sense- und antisense-Primer“) und Elongationsphase (DNA-Synthese). Amplifiziert wird der DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primerbindungsstellen, dessen Länge 1 kb nicht überschreiten sollte. Die Annealing-Temperatur läßt sich nach der „2+4“-Formel berechnen, nach der 4°C pro Cytidin- und Guanodin- sowie 2°C pro Adenosin- und Thyminrest des Primers addiert werden. Die verwendete DNA-Polymerase (Taq Polymerase) stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, ist hitzestabil und arbeitet am effektivsten bei 72°C. Die Phasendauer ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA und beträgt in der Regel 1 min. Die Kopienzahl steigt etwa bis zum 15. Zyklus exponentiell; sobald die Taq Polymerase zum limitierenden Faktor wird, ist nur noch ein linearer Anstieg möglich. Letztlich wird ein „Sättigungsbereich“ erreicht, in dem die Kopienzahl fast stagniert.

Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt hergestellt:

2,5 µl	10 x Taq Polymerase Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 500 mM KCl; 00 mM Tris/HCl (pH 9); 11% Triton X-100)
19,5 µl	H <sub>2</sub> O

2,5  $\mu$ l wurden diesen 22  $\mu$ l entnommen und mit 0,5  $\mu$ l Taq Polymerase (2 U/ $\mu$ l) versetzt (=3  $\mu$ l „Enzym-Mix“). Dem verbleibenden Ansatz (19,5  $\mu$ l) wurden zugesetzt:

1 $\mu$ l	Matrizen-DNA
1 $\mu$ l	dNTP Mix (jeweils 2,5 mM)
0,5 $\mu$ l	sense-Primer (10 pmol)
0,5 $\mu$ l	antisense-Primer (10 pmol)

Die Ansätze wurden anschließend mit je 30  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet (Verdunstungsschutz) und in den Thermocycler gegeben. Nach dem ersten Denaturierungsschritt (95°C, 5 min) wurde in einem sogenannten Hot Start (zur Verhinderung unspezifischer Taq Polymerasentätigkeit vor Primer-Annealing) bei 70°C je 1 U Taq Polymerase im Enzym-Mix (3  $\mu$ l) zugegeben. Folgender Zyklus wurde, wenn nicht anders beschrieben, 35 x durchlaufen (n = Zykluszahl):

1 min	94°C	Denaturierung
1 min	54°C – 63°C	Annealing
1 min + n sec	72°C	Elongation

Es folgte eine Inkubation über 10 min bei 72°C und die Abkühlung auf die Aufbewahrungstemperatur von 4°C.

Pipetten, RGs, Wasser, Lösungen sowie die Pipettenspitzen mit Filter wurden zur Zerstörung von Nukleinsäuren vor Verwendung mindestens 15 min mit UV-Licht bestrahlt.

Als Matrizen-DNA wurde cDNA oder genomische DNA eingesetzt. Die Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen.

### 3.2.7 Proteinase K-Behandlung

Vor der Klonierung von PCR-Amplifikaten wurde der gesamte PCR-Ansatz zur Zerstörung der häufig noch am 3' Ende des Amplifikats befindlichen Taq Polymerase mit der Serin-Endopeptidase Proteinase K des Pilzes *Tritirachium album limber* behandelt. Nach dem Proteinase K-Verdau der Taq Polymerase nimmt die Effizienz der Klonierung von PCR-Produkten deutlich zu (Crowe et al., 1991).

Dazu wurden 0,03 µl Proteinase K (10 mg/ml); 0,0125 µl 3% SDS und 0,025 µl 0,5 M EDTA zu 1 µl des PCR-Ansatzes gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56°C. Nach einmaliger Extraktion mit einem gleichen Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) wurde die DNA präzipitiert. Dazu wurden der DNA-haltigen Aquaphase 2 Vol 96% Ethanol und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat zugefügt, mindestens 3 Stunden wurde die DNA bei -20°C gefällt, und das Pellet wurde nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol (20 min, 15 000 Upm) in 33 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.2.8 Erzeugung von blunt ends

Das Enzym T4-DNA-Polymerase besitzt sowohl 5' → 3' Polymeraseaktivität als auch 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Mittels der Exonukleaseaktivität wurden dATPs, die die Taq Polymerase häufig nach Gegenstrangsynthese an das 3' Ende bindet, abgetrennt. Die Exonukleaseaktivität ist etwa um den Faktor 200 höher als die Polymeraseaktivität, wird jedoch durch die Polymeraseaktivität gehemmt. Vor einer Ligation von PCR-Amplifikaten wurden glatte, phosphorylierte DNA-Enden, sogenannte blunt ends, von Fragmenten erzeugt, welche zuvor sowohl ein 3'- als auch ein 5'-überhängendes Ende besaßen (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde folgender Ansatz hergestellt:

33 µl	DNA in H <sub>2</sub> O
1 µl	dNTP Mix (jeweils 2,5 mM)
4 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Polymerase (4 U/µl)
1 µl	T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Enzyme 10 min bei 68°C inaktiviert. Die DNA wurde bei 0°C oder –20°C aufbewahrt. Nach Agarosegelelektrophorese und Elution der DNA aus dem Gel nach dem Jetsorb-Protokoll (Genomed GmbH) konnte die DNA mit einem Vektor ligiert werden.

### 3.2.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Vor der Ligation wurden linearisierte Vektor-DNA und die als Insert dienenden PCR-Amplifikate (nach Proteinase K-Behandlung und blunt end-Erzeugung) mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend nach dem Jetsorb-Protokoll (Jetsorb Gel Extraction Kit, Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) aus dem Agarosegel isoliert. Die entsprechenden DNA-Banden, sichtbar unter UV-Licht, wurden dazu mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in RGs überführt (600 mg Insert, 2,4 µg Vektor) und in den zugehörigen Puffern genau nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Die DNA-Pellets wurden anschließend in 15 - 20 µl TE aufgenommen.

### 3.2.10 Restriktionsenzymatische DNA-Spaltung

Doppelsträngige DNA kann von bakteriellen Restriktionsenzymen an bestimmten Erkennungssequenzen hydrolytisch gespalten werden. Diese spezifisch erkannten Sequenzen sind meist 4 - 8 bp lang. Unter Einsatz von Restriktionsenzymen läßt sich DNA identifizieren (Restriktionslängenpolymorphismenanalyse), DNA-Fragmente bestimmter Länge können erzeugt und zirkuläre DNA kann linearisiert werden.

Alle Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben und zur Gewährleistung voller Funktionalität in den empfohlenen Puffern verwendet. 1 – 5 U des Restriktionsenzym wurden pro µg DNA eingesetzt. Die Enzyme befinden sich in Glycerin, welches Enzymspezifitäten zu verändern vermag, wenn es in zu hoher Konzentration vorliegt. Eine Agarosegelelektrophorese bestätigte die erfolgreiche Spaltung.

Zur Linearisierung des Klonierungsvektors pBluescript<sup>®</sup> II KS +/- (2961 bp; Abb. 7) mit EcoR V wurden 5 µg Vektor-DNA mit 20 U EcoR V in 40 µl 1 x Puffer für EcoR V aufgenommen, nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde Shrimp alkalische Phosphatase (SAP; 0,2 U/3 kbp) zugegeben, der Ansatz wurde 15 min bei 65°C inkubiert und bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

Beim Plasmidverdau (= Verdau des Klonierungsvektors Bluescript<sup>®</sup> II KS +/- nach Ligation) mit BssH II wurde der Ansatz (0,5 µl BssH II; 1 µl 10 x Puffer für BssH II; Plasmid-DNA in 0,5 µl TE oder H<sub>2</sub>O; 0,5 µl RNase; 7,5 µl H<sub>2</sub>O) ca. 2 Stunden bei 50°C inkubiert. Ziel war das Ausschneiden einer Sequenz von ca. 530 bp, die das Insert (Vα8+ TCR α+) enthielt, zur Bestätigung der erfolgreichen Integration des Inserts in den Vektor.

### 3.2.11 Ligation

DNA-Ligasen verbinden zwei DNA-Strangenden kovalent. Zur Ligation „glatter“ DNA-Enden (blunt ends, s. Kap. 3.2.8) wurden Vektor (2961 bp; 500 ng in TE) und Insert (ca. 300 bp; 500 ng in TE) in einem molaren Verhältnis von 1 : 10 (Vektor : Insert) eingesetzt. Folgender Ansatz wurde hergestellt:

14 µl	DNA in TE (500 ng Vektor, 500 ng Insert)
2,0 µl	ATP (5 mM)
1,0 µl	T4-Ligase (3 U/µl)
2,0 µl	10 x Ligase-Puffer
1 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz (1000 ng DNA in 20 µl) wurde ca. 15 Stunden bei RT inkubiert und anschließend in superkompetente Bakterien transformiert (s. Kap. 3.2.12).

Als Vektor wurde der pBluescript<sup>®</sup> II KS +/- Plasmid-Vektor (Stratagene, Heidelberg; Abb. 7) verwendet, der eine multiple cloning site (MCS) und ein Ampicillinresistenzgen enthält (s. Kap. 4.2.2) und linearisiert worden war (s. Kap. 3.2.10). Insert von ca. 300 bp

Länge war das  $V\alpha 8+$  TCR $\alpha$  PCR-Amplifikat (PCR mit  $V\alpha 8-$  und  $C\alpha$ -Primer, Proteinase K-Behandlung, Erzeugung von blunt ends, Agarosegelelektrophorese).

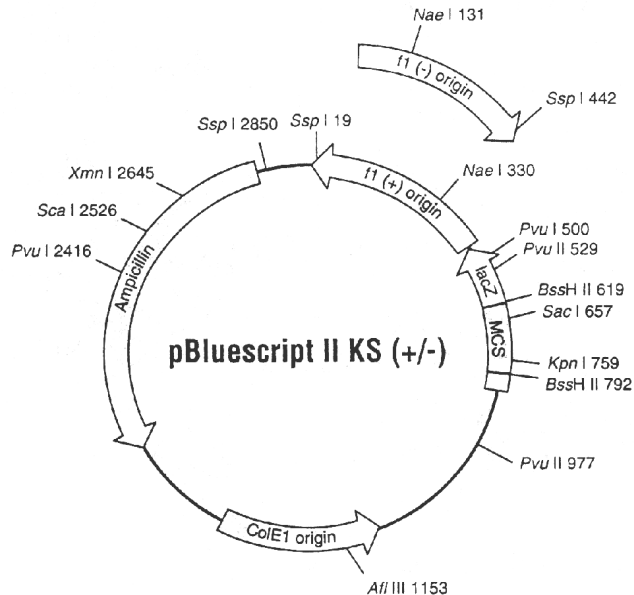


Abb. 7: pBluescript<sup>®</sup> II KS<sup>+/-</sup> Plasmid-Vektor (Stratagene, Heidelberg).  
Genbank<sup>®</sup> # X52327 [KS(+)] & # X52329 [KS(-)] (pUC 19).

### 3.2.12 Transformation

50  $\mu$ l superkompetente Bakterien (Epicurian Coli XL1-Blue MRF<sup>'</sup>; -70°C) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,85  $\mu$ l Mercaptoethanol 1,42 M versetzt. Es wurde vorsichtig gemischt und 10 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden 100 ng der DNA des Ligationsansatzes in 2  $\mu$ l TE zugegeben (s. Kap. 3.2.11). Es folgten eine 30-minütige Inkubation auf Eis, der für die DNA-Aufnahme in die Bakterien entscheidende Hitzeschock (42°C über 45 sec) und die sofortige 2-minütige Abkühlung auf Eis. Anschließend wurden zur Unterstützung der bakteriellen Stoffwechselaktivität 450  $\mu$ l vorgewärmtes SOC-Medium zugefügt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Bakterien im Abstand von 10 min mit 250 Upm geschüttelt. In dieser Zeit erfolgte die Expression des Ampicillinresistenzgens.

Nun folgte der Ausstrich der Bakterien (75 µl Suspension, unverdünnt) mit einer ausgeglühten Impföse auf LB/Ampicillin-Agarplatten. Transformierten Bakterien war durch den Klonierungsvektor Ampicillinresistenz verliehen, nicht transformierte Bakterien proliferierten nicht. Die Agarplatten wurden 20 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei sichtbare Einzelkolonien wuchsen, dann bei 4°C aufbewahrt.

### 3.2.13 Hybridisierung

Durch die Hybridisierung können Bakterienklone detektiert und isoliert werden, deren Plasmid-DNA eine bestimmte Sequenz enthält, die mit Hybridisierungssonden markiert wird. Wir benutzten die Hybridisierung, um diejenigen Klone zu isolieren, in deren Plasmid das TCR V $\alpha$ 8+ Insert integriert war. Als Sonden wurden zwei zur Sequenz des Inserts komplementäre, radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet: V $\alpha$ 8-Primer und C $\alpha$ -Primer.

#### 3.2.13.1 Übertragung von Bakterien-DNA auf Nitrozellulosefilter

Bakterienklone auf Agarplatten wurden nach ca. 20-stündigem Bebrüten bei 37°C auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Dazu wurde die Filtermembran 10 - 20 min auf den Agar gelegt und etwas angedrückt, dann vom Agar abgezogen. Membran und Agarplatten wurden dabei so markiert, daß eine spätere Zuordnung von Abdruck auf Filtermembran und Bakterienklon auf der Agarplatte gewährleistet blieb.

Zur Lyse der Bakterien und DNA-Fixation in einzelsträngiger Form wurde die Filtermembran anschließend einer Alkalibehandlung unterworfen. Dazu erfolgte ein 10-minütiger Kontakt mit einem mit 0,5 N NaOH-Lösung getränkten Whatmann 3MM Filterpapier.

Es folgte die Neutralisation mittels eines 3MM Papiers, das mit einem Neutralisationspuffer (0,2 M Tris, pH 7,5; 1 M NaCl) getränkt worden war. Der Nitrozellulosefilter wurde dann kurz in einem zweiten Neutralisationspuffer in einer Petrischale (Phosphatpuffer: 0,5 N NaCl; 0,05 N EDTA; 25 mM NaPO<sub>4</sub>; pH 8) gewaschen und 30 min bei 60°C getrocknet.

### 3.2.13.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Ein Aliquot der Prähybridisierungslösung (10 ml) mit Heringssperma-DNA zur Blockade unspezifischer Bindungen wurde 15 min zur DNA-Denaturierung erhitzt (70°C), schnell auf Eis abgekühlt und dann in eine Petrischale gegeben. In dieselbe Petrischale wurden die Nitrozellulosefilter mit Bakterien-DNA gelegt. Die Prähybridisierung wurde 45 min bei 52°C unter kontinuierlicher Rotation durchgeführt.

Zur Hybridisierung wurden die Membranen 50 min ebenfalls bei 52°C und ständiger Rotation in einer zweiten Petrischale mit der die Hybridisierungssonden enthaltenden Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 10 min bei RT gewaschen (1 x SSC mit 0,1% SDS) und bei 60 - 80°C 40 min getrocknet.

Nun wurde sie zwei Tage in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Die eindeutige Zuordnung von ursprünglichem Bakterienklon (Agarplatte) und Signal auf dem Röntgenfilm blieb gewährleistet.

#### *Prähybridisierungslösung:*

5 x SSC

2 x Denhardt Lösung

0,2% SDS

100 µg/ml Heringssperma-DNA (gelöst in aqua destillata)

#### *Hybridisierungslösung:*

Die Oligonukleotide (V<sub>α8</sub>- und C<sub>α</sub>-Primer) wurden mit <sup>32</sup>P-ATP am 5' Ende radioaktiv markiert. Folgender Ansatz (10 µl) wurde dazu hergestellt:

30 µC      <sup>32</sup>P-ATP

20 U      T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl; MBI Fermentas GmbH)

2 µl      5 x Kinase-Puffer

100 - 200 ng V<sub>α8</sub> Primer (26,9 µM)

100 - 200 ng C<sub>α</sub> Primer (32,2 µM)



Es wurde eine Stunde bei RT inkubiert, dann wurde die Reaktion durch 10-minütige Hitzeinaktivierung bei 65°C abgebrochen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Unmittelbar vor der Hybridisierung wurde der Ansatz zur Denaturierung 10 min auf 95°C erhitzt, schnell auf Eis abgekühlt und zu ca. 10 ml der Prähybridisierungslösung gegeben. Damit war die Hybridisierungslösung hergestellt.

#### 3.2.14 Autoradiographie

Radioaktiv markierte, getrocknete Sequenzgele und Nitrozellulosemembranen wurden Röntgenfilmen in Filmkassetten in einer Dunkelkammer exponiert. Zur Verstärkung der Signale diente eine Verstärkerfolie. Die Filme wurden nach einer Expositionsdauer von mindestens einem Tag in Kodak-Entwickler und -Fixierer entwickelt.

#### 3.2.15 Bakterienanzucht

Einzelkolonien wurden vor der Bildung von Satellitenkolonien mit Zahnstochern von einer Agarplatte in 3 ml LB Medium + Ampicillin (50 µg/ml LB Medium) übertragen und über Nacht bei 37°C und ca. 180 Upm in einem Bakterienschüttler geschüttelt. Kurzfristige Aufbewahrung erfolgte bei 4°C. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Aliquots dieser Übernachtskultur im Verhältnis 8,5 : 1 mit sterilem Glycerin gemischt und bei -20°C gelagert.

#### 3.2.16 Plasmidisolierung

##### 3.2.16.1 Plasmidisolierung durch alkalische Extraktion (Mini-Prep)

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien nach der Methode der alkalischen Extraktion nach Morelle (1989) isoliert. Im alkalischen Milieu denaturiert DNA. Bei anschließender Neutralisation bildet lineare (chromosomale) DNA unlösliche Netzwerke, wohingegen

covalently closed circular (= ccc) Plasmid-DNA wieder renaturiert, also wieder in nativer Konfiguration vorliegt. SDS denaturiert Proteine. Denaturierte Proteine und die Präzipitate chromosomaler DNA lassen sich abzentrifugieren. Eine abschließende Ethanol-fällung reinigt die isolierte Plasmid-DNA.

Eine Übernachtskultur (3 ml) eines transformierten Bakterienklons in LB/Ampicillin-Medium wurde angefertigt. Der Klon wurde 20 sec bei 4°C und 15 000 Upm pelletiert, in 100 µl GTE Puffer aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. 200 µl einer Alkalilösung (0,2 N NaOH; 1% SDS; pH 12) wurden zugefügt, 6 – 8 x wurde das RG vorsichtig umgeschwenkt und 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat zur Neutralisation zugefügt und vorsichtig gemischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C, während welcher chromosomale DNA, hochmolekulare RNA und Proteine präzipitierten. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 15 000 Upm wurde der klare Überstand mit der Plasmid-DNA in ein neues RG überführt. Es wurden 800 µl Ethanol (96%) zugegeben, und nach 10-minütiger Inkubation, während derer die Plasmid-DNA präzipitierte, wurde wiederum 10 min bei 15 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, bevor es in 35 µl TE resuspendiert wurde. Dazu mußte es 20 – 30 x mit 5 – 10 µl TE überspült werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

### 3.2.16.2 Plasmidisolierung mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Mini-Prep; Qiagen, Hilden)

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde zumeist das Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden), welches eine alkalische DNA-Extraktion mit der DNA-Reinigung über Anionenaustauschsäulen kombiniert, eingesetzt.

Ein Aliquot (3 ml) einer Bakterienübernachtskultur (LB/Ampicillin) der transformierten Bakterien wurde bei 15 000 Upm 25 sec zentrifugiert und in 300 µl gekühlten P1-Puffer (pH 8) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl alkalischem P2-Puffer (mit SDS) wurde das RG 5 x geschwenkt und exakt 5 min bei RT inkubiert. 300 µl P3-Puffer (pH 5,5) wurden dem Gemisch zugegeben, 10 min wurde auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde das RG wiederholt umgeschwenkt. Nach 15-minütiger Zentrifugation

bei 15 000 Upm wurde der Überstand auf eine mit 1 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Anionenaustauschsäule wurde 4 x mit 1 ml QC-Puffer gespült, bevor die Plasmid-DNA letztlich mit 0,8 ml QT-Puffer eluiert und in einem neuen RG, dem 560 µl Isopropanol zugesetzt waren, aufgefangen wurde. 30 min wurde bei 14 000 Upm zentrifugiert. Das Pellet von ca. 5 µg DNA wurde einmal vorsichtig mit auf 0°C gekühltem 70% Ethanol gewaschen, 5 - 10 min luftgetrocknet und in 15 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

### 3.2.17 Sequenzierung

Inserts (klonierte V8α+ TCRα-Transkripte) wurden stets in beide Richtungen sequenziert, d. h. mit einem sense- und einem antisense-Primer. Die verwendeten Sequenzierungsprimer (CCC-Primer und NOR-Primer) hybridisierten dabei mit Sequenzen, die sich beidseits in unmittelbarer Nachbarschaft zum Insert auf dem Klonierungsvektor befanden. Auch unklonierte PCR-Produkte wurden stets in beide Richtungen sequenziert.

#### 3.2.17.1 Sequenzierung mit dem T7 Sequencing™ Kit (Pharmacia); Auftrennung über ein vertikales Sequenzierungsgel

Klonierte DNA wurde nach der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., 1977) mit dem T7 Sequencing™ Kit (Pharmacia, Freiburg) sequenziert. Die zu sequenzierende DNA wird mit einem Sequenzierungsprimer und einer thermostabilen Polymerase (T7-Polymerase) amplifiziert. Didesoxynukleotide fungieren als Stop-Nukleotide: ihr Einbau führt zum sofortigen Abbruch der Polymerasereaktion. Auf diese Weise entstehen PCR-Amplifikate unterschiedlicher Länge, die dann in einem Sequenzierungsgel aufgetrennt werden können.

Zuerst wurde die Plasmid-DNA denaturiert und mit Ethanol gefällt. 8 µl Plasmid DNA (ca. 5 µg) in H<sub>2</sub>O oder TE wurden mit 2 µl 2 N NaOH bei 37°C 15 min inkubiert. Zugegeben wurden 2 µl 3 N Natriumacetat, 50 µl 96% Ethanol und 8 µl H<sub>2</sub>O. 5 min

wurde im Trockeneis-Ethanolbad (-70°C) inkubiert, dann wurde 15 min zentrifugiert (15 000 Upm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

Zum Annealing wurde das Pellet in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 2 µl Annealingpuffer (T7 Sequencing™ Kit) sowie 10 pmol eines Sequenzierungsprimers (CCC-Primer oder NOR-Primer) wurden zugefügt, und es wurde 5 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und 10 min bei RT inkubiert.

Für die Polymerasereaktion wurden zu dem Ansatz 3 µl Desoxynukleotidgemisch („Label A Mix“: dCTP, dGTP und dTTP), 1 µl <sup>35</sup>S\*dATP und 2 µl T7-Polymerase (1,5 U/µl in Polymerase-Dilutionspuffer, jeweils T7 Sequencing Kit) gegeben, und dieser Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert.

Je 4,5 µl des Ansatzes wurden nun in vier verschiedene RGs gegeben, die jeweils 2,5 µl eines Didesoxyukleotids (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enthielten und auf 37°C vorgewärmt waren. Weitere 5 min wurde bei 37°C inkubiert, bevor je 5 µl Formamidpuffer („Stop-Mix“) zum Beenden der Reaktion zugegeben wurde.

Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe eines vertikalen 8%igen Polyacrylamid-Sequenzierungsgels bei 40 W aufgetrennt. Das Sequenzierungsgel bestand aus:

16 ml	Gelkonzentrat (Acrylamid/Bisacrylamid 1 : 19)
5 ml	10 x TBE
29 ml	8,3 M Harnstoff in H <sub>2</sub> O
100 µl	TEMED
250 µl	APS 10%

Die vier Proben wurden vor dem Auftragen 2 min auf 75°C erhitzt und so denaturiert. Es fand ein mindestens 30-minütiger Gelvorlauf vor Probenauftrag (jeweils 2 µl) statt zur Erwärmung der Apparatur.

Nach dem Gellauf erfolgte eine 15-minütige Fixierung des Gels in 10% Essigsäure und das Trocknen (2 Stunden, 80°C) auf einem Whatman-Papier im Geltrockner. Im Anschluß wurde das Gel einem Röntgenfilm exponiert.

Dieses Verfahren mit einer Auftrennung der Sequenzierungsprodukte über ein vertikales Gel wurde selten angewandt.

### 3.2.17.2 Sequenzierung mit dem ABI PRISM Ready Reaction Kit (Perkin Elmer); Auftrennung im 373 A DNA-Sequenzierer

Dieses Kit basiert ebenfalls auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977) und setzt fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zum basenspezifischen Strangabbruch ein. Es wurde nur ein Ansatz pro DNA-Probe hergestellt, der alle vier Stop-Nukleotide enthielt, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren.

60 ng	Plasmid DNA in H <sub>2</sub> O (Richtwert: 500 ng bei 3kb)
5 pMol	Sequenzierungsprimer (CCC- oder NOR-Primer)
8 µl	„Terminator Ready Reaction Mix“ (Perkin Elmer): Ampli Taq Polymerase mit Puffer; dNTPs; ddNTPs (+Fluoreszenzfarbstoffe)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Das Gemisch wurde mit 30 µl Paraffinöl überschichtet und in einen Thermocycler gegeben, in dem 25 x der folgende Zyklus durchlaufen wurde:

15 sec	96°C
4 min	60°C

Es folgte die Abkühlung auf 4 ° C.

Danach wurden die erzeugten DNA-Fragmente von Verunreinigungen, insbesondere von Nukleotiden, Primern, der Ampli Taq Polymerase sowie dem Paraffinöl, befreit.

Eine schnelles Reinigungsverfahren stellt das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) zur Verfügung. Vorgegangen wurde dabei exakt nach Anleitung des Herstellers und unter Verwendung der empfohlenen Puffer (Attal et al., 1990).

Alternativ erfolgte die Reinigung mit dem Polydextran „Sephadex-G50“ (Pharmacia, Uppsala). Suspendiertes Sephadex-G50 wurde in eine mit einer Glaskugel unvollständig verschlossene Pipettenspitze pipettiert, welche im Deckel eines RG steckte. Nach einer Zentrifugation über 3 min bei 300 Upm lag das Sephadex-G50 in trockener Form in der

Pipettenspitze vor, die nun auf einem zweiten RG fixiert wurde. Die DNA-Fragmente eines Ansatzes (20 µl, ohne Paraffinöl) wurden nun auf das Sephadex-G50 pipettiert. Nach einer Passage des filtrierenden Polydextrans durch erneute Zentrifugation (3 min, 3000 Upm) wurde die DNA in 2 µl (= 1/10 Vol) 3 M Natriumacetat (pH 5,2) aufgenommen und mit 80 µl (= 4 Vol) 96% Ethanol über 10 min bei 4°C gefällt, 5 min bei 15 000 Upm zentrifugiert und mit 70% Ethanol einmal gewaschen. Nach Lufttrocknen des DNA-Pellets wurde dieses bei -20°C aufbewahrt und unmittelbar vor der Auftrennung im DNA-Sequenzierer 2 min bei 90°C in 3 µl 90% Formamid erhitzt. Dann erfolgte die Auftrennung der so gereinigten DNA-Fragmente nach Fragmentlängen im 373A DNA-Sequenzierer (Applied Biosystems, Weiterstadt) per Durchflußchromatographie mit einem Laserstrahl. Bis zu 500 bp ließen sich so in Form eines vierfarbigen Linienchromatogramms darstellen. Jedem Nukleotid wurde eine Farbe zugeordnet, so daß die Farbabfolge des Chromatogramms direkt der Nukleotidsequenz entsprach.

### 3.2.18 Isolierung genomischer DNA

LEW Ratten wurde ein ca. 5 x 5 mm großer Hautbezirk mit einer scharfen Schere aus der Ohrmuschel entfernt. Das Gewebe wurde zerkleinert und 12 h bei 56°C in 750 µl TENS mit 40 µl Proteinase K (10 mg/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Verdau 5 min in einem Mixgerät gemischt. Es folgte die Zugabe von 20 µl RNase A und ein 30-minütiger RNA-Verdau bei 37°C. Zur Proteinfällung wurden 250 µl 6M NaCl zugegeben, und es wurde 7 min mit 15 000 Upm zentrifugiert. Nun wurde der Überstand in ein neues RG überführt und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Die DNA präzipitierte sofort in der Grenzschicht zwischen Isopropanol und Unterphase und wurde mittels einer am vorderen Ende zugeschmolzenen Glaspasteurpipette durch gleichmäßiges Drehen der Pipette in einer Richtung über 1 - 2 min aufgewickelt. Die DNA wurde durch kurzes Eintauchen der Pipettenspitze in 96% und 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE aufgenommen. Dazu wurde die Pipettenspitze mit einem Glasschneider abgetrennt und 2 Stunden bei RT vorsichtig in 300 µl TE geschüttelt. Die genomische DNA wurde bei 4°C

aufbewahrt. DNA-Fragmente konnten nun mittels PCR (Einsatz von 300 ng genomischer DNA; 1 pMol je Primer: sense-Primer „Sal 166“; antisense-Primer „Hepta“ oder „Nona“; Annealing Temperatur: 60°C; 30 Zyklen; kein hot start) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden nach Ethanol-fällung mit dem ABI PRISM Dye Terminator Ready Reaction Kit mit AmpliTaq DNA-Polymerase (FS) sequenziert (s. Kap. 3.2.17.2).

Mit dieser Methode ließen sich kleine DNA-Mengen (< 500 µg DNA) isolieren.

### 3.2.19 Semiquantitative PCR-Analyse des V $\beta$ -Repertoires

Mithilfe einer kompetitiven PCR (Gilliland et al., 1990; Überla et al., 1991; Platzer et al., 1992) wurden cDNA-Proben semiquantitativ analysiert, um dann auf gleiche cDNA-Konzentrationen eingestellt werden zu können. Eine nicht-kompetitive PCR gestattet nur sehr begrenzte Rückschlüsse auf die ursprünglichen Konzentrationen der DNA-Fragmente (vor der PCR), da die Amplifikationsrate einer Fülle von Variablen unterliegt und auch bei gewissenhaftester Kontrolle von Einzelparametern (Konzentration von Primern, dNTPs, Mg<sup>2+</sup>-Ionen, DNA-Polymerase, Temperaturen, Phasenlängen, etc.) keine vollkommene Reproduzierbarkeit der Amplifikationsrate gewährleistet ist (Gilliland et al., 1990).

Der kompetitiven PCR liegt die Überlegung zugrunde, daß das Verhältnis der mRNA, die für das Haushaltsprotein  $\beta$ -Aktin kodiert, zur Gesamt-mRNA in den Zellpopulationen, deren cDNA semiquantitativ analysiert werden soll, gleich ist. Wird die Gesamt-cDNA einer Probe zusammen mit einem  $\beta$ -Aktin-DNA-Kontrollfragment (KF) mit einem  $\beta$ -Aktin-spezifischen Primerpaar amplifiziert, so konkurrieren  $\beta$ -Aktin cDNA und KF um die Primer. Während der Amplifikation bleibt das Verhältnis  $\beta$ -Aktin cDNA : KF konstant. Das KF wurde dabei so hergestellt, daß die Amplifikatlänge sich um ca. 100 bp von der  $\beta$ -Aktin cDNA-Amplifikatlänge unterschied. Die Annealing-Temperatur lag bei 54°C, es wurden 10 pMol pro Primer und PCR-Ansatz (25 µl) eingesetzt, die Zyklenzahl betrug 35. Nach Auftrennung der beiden PCR-Produkte mit einem Agarosegel waren zwei Banden erkennbar,  $\beta$ -Aktin cDNA- und KF-Amplifikat. Die Banden wurden mit der Wincam Software densitometrisch analysiert. Bandendichten wurden dabei angegeben in

% Gesamtbandenintensität (Gesamtbandenintensität =  $\beta$ -Aktin cDNA-Amplifikat-Bandenintensität + KF-Amplifikat-Bandenintensität).

Beim Einsatz einer bestimmten Menge des KF (= KF<sub>50</sub>) besaßen beide Banden dieselbe Dichte (50%). Zur Ermittlung der KF<sub>50</sub> wurden Verdünnungsreihen des KF angefertigt (10er-, dann 2er-Verdünnungsstufen), während die eingesetzte Gesamt-cDNA-Menge konstant blieb. Die genaue Bestimmung der KF-Menge, bei der identische Bandendichten vorlagen, erfolgte graphisch: Die cDNA-Amplifikat-Bandenintensität (in %) wurde gegen die Menge des jeweils eingesetzten KF aufgetragen. So ergab sich ein sigmoider Kurvenverlauf und die KF<sub>50</sub> konnte bei 50% abgelesen werden. Die verschiedenen cDNA-Proben wurden nun so verdünnt, daß die KF<sub>50</sub>-Werte der Proben und damit die Gesamt-cDNA-Konzentrationen identisch waren.

Die cDNA-Proben gleicher Konzentration wurden dann hinsichtlich ihrer Konzentration von TCR V $\beta$  cDNA verglichen. Dazu wurden PCR-Ansätze von 35  $\mu$ l hergestellt. Als Primer wurden ein C $\beta$ -spezifischer sense- sowie 21 V $\beta$ -spezifische antisense-Primer verwendet, die alle beschriebenen V $\beta$ -Segmente der Ratte nachwiesen und freundlicherweise von Herrn Dr. Giegerich, Würzburg, zur Verfügung gestellt waren. Dabei wurden 14 pMol pro Primer und PCR-Ansatz eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden nach 30, 35, 40 und 45 PCR-Zyklen analysiert, indem jeweils ein Aliquot des PCR-Ansatzes (5  $\mu$ l) einer Agarosegelelektrophorese mit Densitometrie unterzogen wurde.



### 3.3 Statistik

Die Wahrscheinlichkeit  $p$ , daß  $n$   $J\alpha$ -Wiederholungen innerhalb von 50 unabhängigen cDNA Klonen nicht zufällig waren, wurde basierend auf der Annahme, daß insgesamt 50  $J\alpha$ -Segmente der Ratte zur Verfügung standen, berechnet. Normalverteilung vorausgesetzt, wurden die folgenden Wahrscheinlichkeiten  $p$  für nicht-zufälligen  $J\alpha$ -Gebrauch errechnet:  $n = 3$ :  $p = 0,34\%$ ;  $n = 4$ :  $37,04\%$ ,  $n = 5$ :  $p = 84,78\%$ ,  $n = 6$ :  $p = 97,62\%$ ,  $n \geq 7$ :  $p \geq 99,69\%$  (s. Kap. 4.2.6). Die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test verglichen, der die Wahrscheinlichkeit berechnete, mit der die für jede Gruppe berechneten Werte von unabhängigen Stichproben stammten (s. Kap. 4.2.10).

### 3.4 Zugangsnummern (EMBL Datenbank)

Die cDNA Sequenzen von zehn im Laufe der Analysen erstmals identifizierten TCR  $J\alpha$ -Gensegmenten RTJA1 – RTJA10 der LEW Ratte wurden unter folgenden Zugangsnummern (accession numbers) in die EMBL Datenbank gestellt (s. Kap. 4.2.5, Tab. 3):

<u>accession number</u>	<u>TCR <math>J\alpha</math></u>
Y09170	RTJA2
Y09171	RTJA5
Y09174	RTJA8
Y09176	RTJA3
Y09177	RTJA1
Y09179	RTJA10
Y09180	RTJA4
Y09182	RTJA9
Y09183	RTJA7
AJ310090	RTJA6

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Zellisolierung

#### 4.1.1 Effektivität der Nylonwollfiltration zur Anreicherung von T-Zellen

LEW LK-Zellen wurden einmal mit Nylonwolle filtriert (s. Kap. 3.1.2). Die Konzentration von  $\alpha\beta$ TCR+ Zellen wurde dadurch von 71% auf 87% erhöht (Abb. 8). Die Zellfärbung für den FACScan erfolgte direkt mit R73-FITC (Spezifität:  $\alpha\beta$ TCR der Ratte).

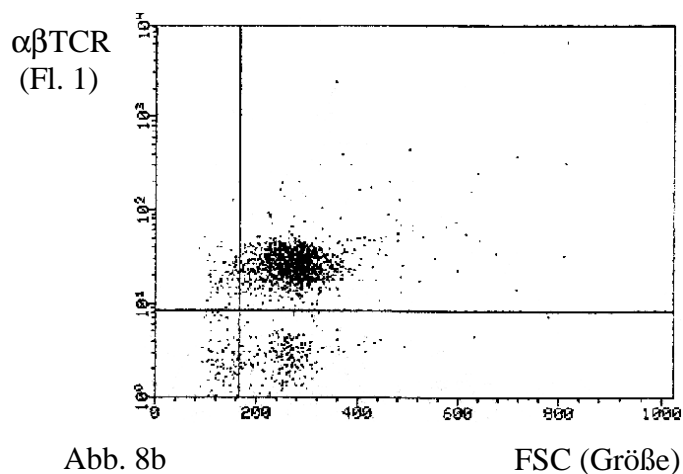
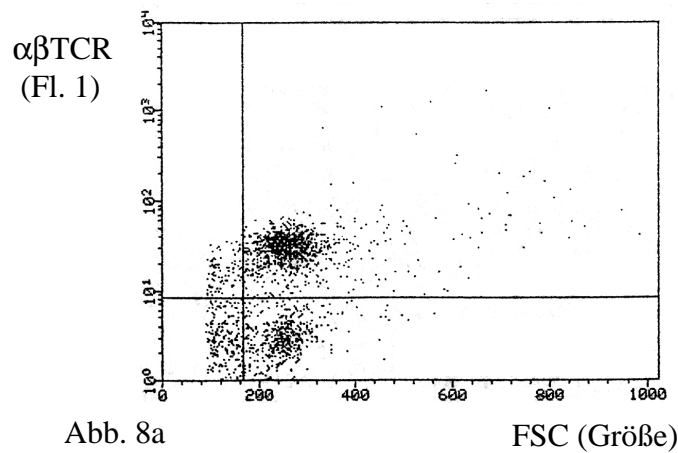


Abb. 8: FACScan-Analyse von LEW LK-Zellen (Fluoreszenz 1: R73-FITC).  
 Abb. 8a: LK-Zellen vor Nylonwollfiltration (s. Kap. 3.1.2).  
 Abb. 8b: Zellen nach Nylonwollfiltration.  
 (jeweils 5000 Ereignisse)

#### 4.1.2 Anreicherung von CD8 T-Zellen durch Nylonwollfiltration und magnetisch-aktivierten Zellsort

2 x 10<sup>8</sup> LK-Zellen der LEW Ratte wurden mit Nylonwolle filtriert. Anschließend wurden B-Zellen und CD4+ T-Zellen immunmagnetisch durch negative Selektion mit den CD4-spezifischen mAk W3/25 und Ox35 depletiert (MACS<sup>®</sup>; s. Kap. 3.1.2 und 3.1.3). Zellpopulationen wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert. Mit der Kombination von Nylonwollfiltration und MACS<sup>®</sup> wurde eine Anreicherung der T-Zellen (CD5+) von 77% auf 90,5% erzielt, CD8+ T-Zellen wurden von 18,6% auf 84% konzentriert (Tab. 1). Für die Färbungen wurden die mAk Ox19, Ox8 und 341 verwendet, spezifisch für die Oberflächenmoleküle CD5, CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$ . Abb. 9 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser LEW LK-Zellen nach Nylonwollfiltration und immunmagnetischem Zellsort.

Bei der positiven Selektion mit dem MACS<sup>®</sup> mit dem V $\alpha$ 8-spezifischen mAk G177 war ein großer Verlust von CD8+ T-Zellen zu verzeichnen, so daß keine Konzentrierung gelang, sondern sogar eine Verringerung des Anteils V $\alpha$ 8+ T-Zellen von 8,3% auf 5,1% stattfand. Daher wurde auf das Verfahren der positiven Selektion verzichtet.

	<b>CD5+ (Ox19+)</b> T-Zellen	<b>CD8<math>\alpha</math>+ (Ox8+)</b> CD8+ T-Zellen und NK	<b>CD8<math>\beta</math>+ (341+)</b> CD8+ T-Zellen
<b>vor Nylonwollfiltration</b>	77%	19,5%	18,6%
<b>nach Nylonwollfiltration</b>	87%	23,5%	23,7%
<b>nach CD4+ T-/B-Zell- Depletion mit MACS<sup>®</sup></b>	90,5%	88,1%	84%

Tab. 1: Anreicherung von CD5+, CD8 $\alpha$ + und CD8 $\beta$ + LEW LK-Zellen mit der Kombination von Nylonwollfiltration und MACS<sup>®</sup> (s. Kap. 3.1.2 und 3.1.3).

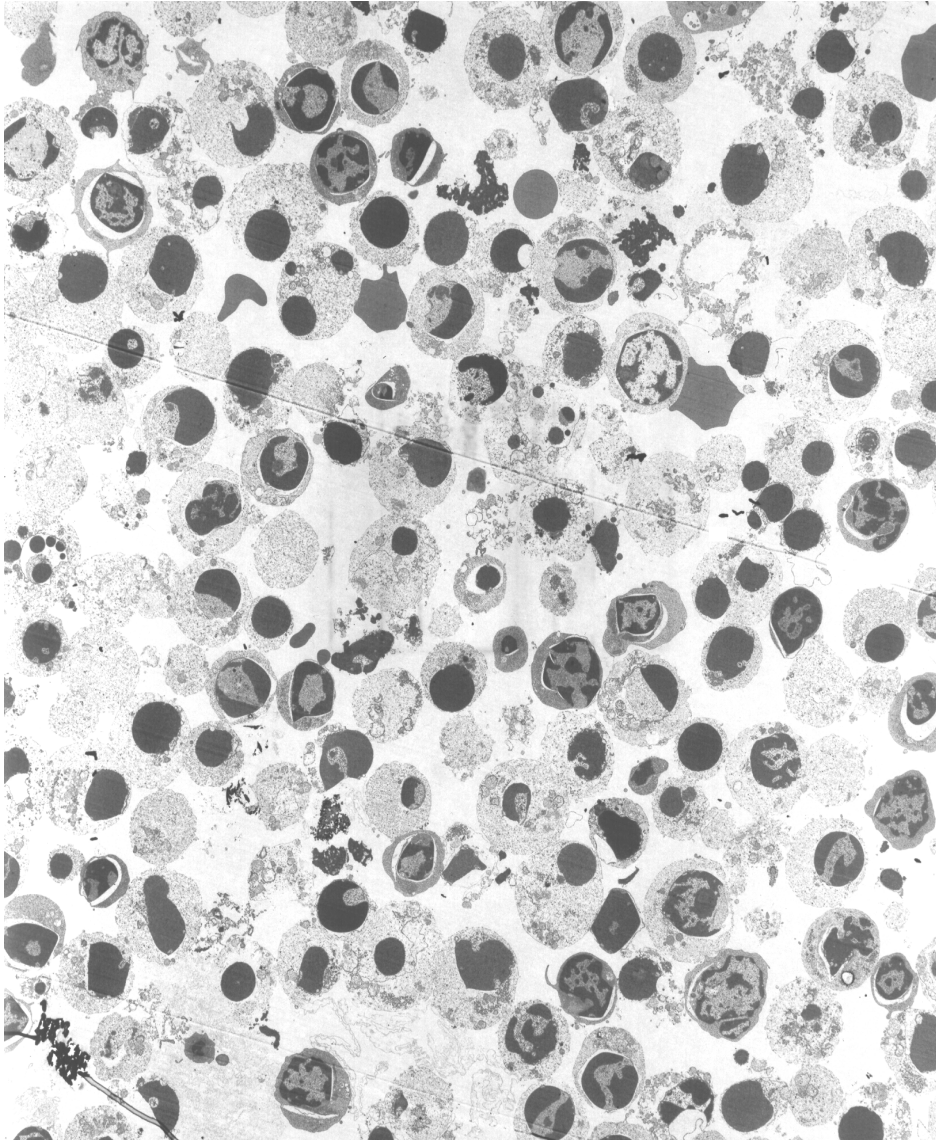


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von LEW LK-Zellen nach Nylonwollfiltration und immunmagnetischem Zellsort mit den mAk W3/25 und Ox35 im MACS® (1890-fache Vergrößerung, Foto: Dr. N. Deutschländer).

#### 4.1.3 Isolierung von RT1f-alloreaktiven mAk G177+ peripheren LEW CD8 T-Zellen

$3,4 \times 10^8$  LK-Zellen von 10 Wochen alten LEW Ratten ( $n = 2$ ) wurden mit Nylonwolle filtriert (s. Kap. 3.1.2) und anschließend einer immunmagnetischen B- und CD4+ T-Zelldepletion mit dem MACS<sup>®</sup> unterzogen (s. Kap. 3.1.3, negative Selektion mit den mAk W3/25 und Ox35). Nach der Nylonwollfiltration waren noch  $1,28 \times 10^8$  LK-Zellen, nach dem immunmagnetischen Zellsort noch  $7,4 \times 10^6$  LK-Zellen vorhanden. Die so gereinigten Zellen waren zu 80 - 90%  $\alpha\beta$ TCR+ CD8 $\beta$ + T-Zellen (Tab. 1). Sie wurden als responder-Zellen in eine gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) mit 72 wells eingesetzt (s. Kap. 3.1.7). Dabei wurden pro well  $10^5$  responder-Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium + IL-2 (200 U/ml) eingesetzt.

Aus der Milz einer drei Monate alten LEW.1F Ratte wurden  $1,6 \times 10^6$  dendritische Zellen (DC) präpariert (s. Kap. 3.1.1.1) und mit 3500 rad bestrahlt. Die DC wurden dann als Stimulatorzellen in die gleiche MLR eingesetzt (pro well  $10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Dutch RPMI Medium).

In der MLR sollte eine RT1f-spezifische Expansion der TCR V $\alpha$ 8+ CD8 T-Zellen erfolgen (Torres-Nagel et al., 1994). Nach viertägiger Kultur vermehrte sich die Gesamtzellzahl von  $7,9 \times 10^6$  um den Faktor 1,52 auf  $1,2 \times 10^7$  Zellen.

Mittels FACS wurden nach der MLR V $\alpha$ 8+ CD8 T-Zellen isoliert. Die Zellen wurden dazu mit dem mAk G177-bio + Streptavidin-PE (Fl. 1; Spezifität: V $\alpha$ 8) gefärbt (s. Kap. 3.1.6). Ein FACScan zeigte, daß sich der Anteil G177+ T-Zellen während der Stimulation mit RT1A<sup>f</sup> in der MLR von 2% (Torres-Nagel et al., 1994) auf 6 - 7% erhöht hatte (Abb. 10a). Der FACS isolierte G177+ T-Zellen mit einer Reinheit von 89,8% (Abb. 10b). In der G177-negativen Fraktion lagen G177+ T-Zellen nur zu < 1% vor. Nach dem Zellsort wurden die RT1f-alloreaktiven G177+ T-Zellen ( $n = 2 \times 10^5$ ) 2,5 Tage in Kultur genommen (Kulturmedium + IL-2; 200 U/ml), bevor RNA isoliert wurde.

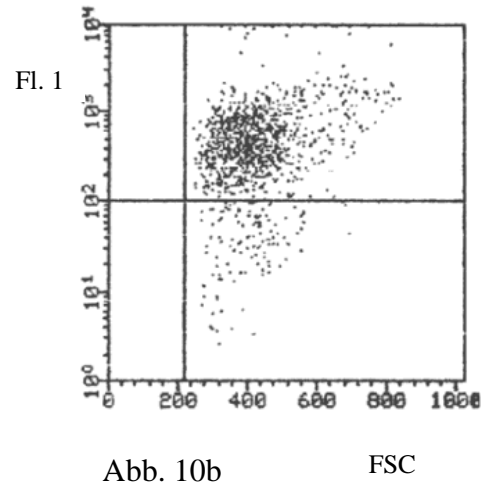
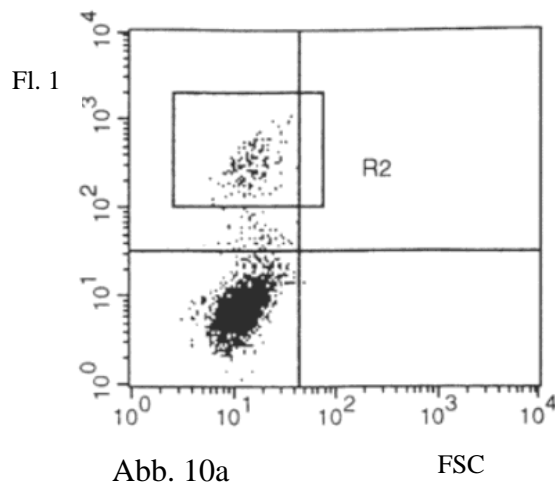


Abb. 10: Fluoreszenzaktivierter Zellsort von RT1f-alloreaktiven, TCR V $\alpha$ 8+ LEW LK-Zellen. Abszisse: FSC (Größe). Ordinate: Fluoreszenz 1 (G177-bio und SA-PE).

Abb. 10a: FACScan der Zellen nach MLR (Stimulation von LEW CD8 T-Zellen mit RT1A<sup>f</sup>) und unmittelbar *vor dem Zellsort*. 6 – 7% der RT1f-alloreaktiven Blasten sind V $\alpha$ 8+ (R2).

Quadrant links oben: 8,33%. Quadrant links unten: 91,63%. Quadrant rechts oben: 0%. Quadrant rechts unten: 0,04%.

Gate: 2449 Ereignisse. Ereignisse insgesamt: 10 000.

Abb. 10b: Dieselben Zellen direkt *nach dem Zellsort*. 89,8% der isolierten Zellen sind V $\alpha$ 8+ (mAk G177+). Fluoreszenz 1: G177-bio und SA-PE.

Quadrant rechts oben: 89,8%. Quadrant rechts unten: 10,2%. Quadrant links oben und unten: 0%.

## 4.2 J $\alpha$ -Gebrauch und CDR3 $\alpha$ -Regionen

### 4.2.1 PCR-Amplifikation von V $\alpha$ 8+ TCR cDNA RT1f-alloreaktiver LEW CD8 T-Zellen

Von ca.  $2 \times 10^5$  RT1f-alloreaktiven, zu ca. 90% V $\alpha$ 8+ (mAK G177+) peripheren LEW CD8 T-Zellen wurde zytoplasmatische RNA präpariert und zu dieser wurde cDNA hergestellt (s. Kap. 3.2.4 und 3.2.5). Bei den RT1f-alloreaktiven T-Zellen handelte es sich um polyklonale Blasten, die aus einer MLR stammten, in der sie vier Tage mit bestrahlten LEW.1F DC (RT1f+) stimuliert wurden (s. Kap. 3.1.7). Vor Einsatz in die

MLR wurden diese LK-Zellen wie üblich mit Nylonwolle und MACS<sup>®</sup> (mAK: W3/25 und Ox35) gereinigt (s. Kap. 4.1.3).

Die cDNA wurde einer PCR unterworfen (s. Kap. 3.2.6). Dabei wurden als Primer eingesetzt:

sense-Primer:  $V_{\alpha 8}$ -Primer: 5' GGA GAC TCC GTG ACT CA 3'  
 antisense-Primer:  $C_{\alpha}$ -Primer: 5' GGC TCT GGG TCT GTG ACA 3'

So wurde cDNA amplifiziert, die für die  $V_{\alpha 8}$ + TCR $\alpha$ -Kette kodiert. Die  $V_{\alpha 8}$ - und  $J_{\alpha}$ -Sequenzen wurden dabei in voller Länge amplifiziert, weiterhin wurden ca. 20 Nukleotide des 5' Endes von  $C_{\alpha}$  amplifiziert.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz zum Abbau der Taq-Polymerase einer Proteinase K Behandlung unterzogen (s. Kap. 3.2.7). Die Proteinase K wurde im folgenden Schritt extrahiert (s. Kap. 3.2.7). Nach der Erzeugung von phosphorylierten blunt ends mit T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA-Polymerase wurde der gesamte Ansatz mit einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, und die PCR-Produkte in der Größe von ca. 360 bp wurden nach dem Jetsorb-Protokoll aus dem Gel eluiert (s. Kap. 3.2.8 und 3.2.9).  $V_{\alpha 8}$ + TCR $\alpha$  PCR-Amplifikate stand dann als Insert zur Ligation zur Verfügung.

#### 4.2.2 Klonierung und Sequenzierung

Zur Klonierung wurde der Vektor Bluescript<sup>®</sup> II KS +/- benutzt, der mit dem Plasmid pUC19 verwandt ist (Abb. 7, Kap. 3.2.11). Der Vektor der Länge 2961 bp enthält eine Multiple Cloning Site (MCS; bp 657 - 759) und ein Ampicillinresistenzgen (bp 1975 - 2832).

Nach der Linearisierung mit dem Restriktionsenzym EcoR V, dessen Schnittstelle in der MCS liegt (bp 715 - 716), wurde der Ansatz mit einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Vektor wurde dann mit dem Jetsorb gel extraction kit aus dem Gel eluiert (s. Kap. 3.2.9).

Nun wurde eine Ligation durchgeführt, bei der je ein V $\alpha$ 8+ TCR $\alpha$ + PCR-Amplifikat in die Schnittstelle eines Vektors inserierte (Abb. 11; s. Kap. 3.2.11 und 4.2.1).

Die so erhaltenen Plasmide wurden in superkompetente Epicurian Coli®XL-1 Blue MRF' Bakterien (Stratagene, Heidelberg; Effizienz:  $> 1 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g pUC18 DNA) transformiert (s. Kap. 3.2.12).

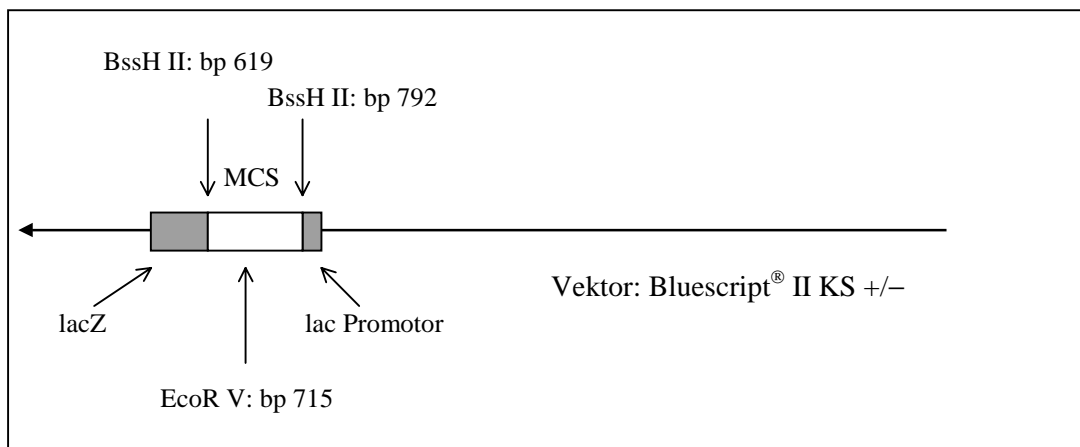


Abb. 11a

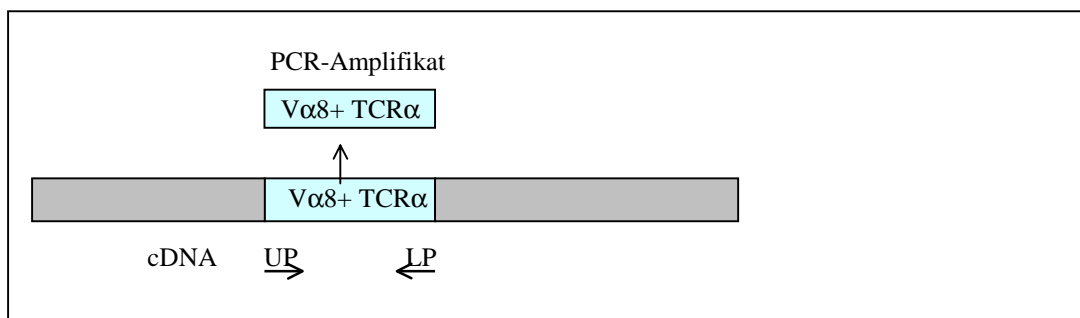


Abb. 11b



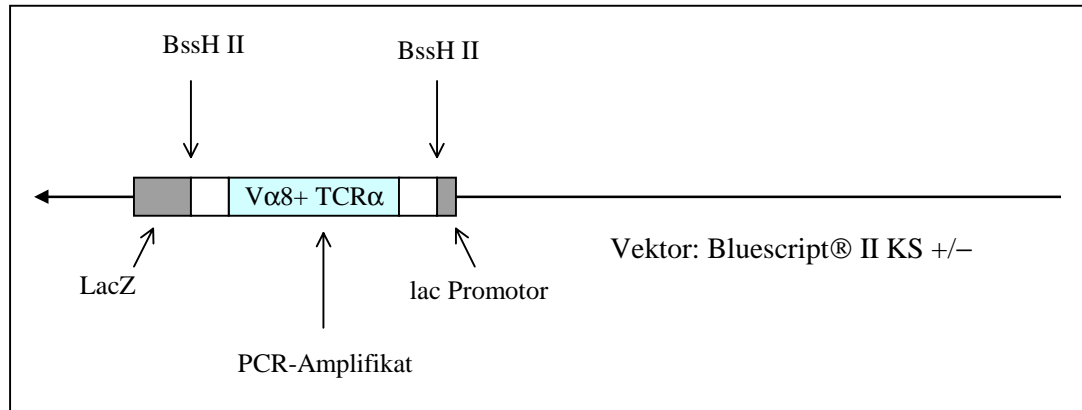


Abb. 11c

Abb. 11: Ligationsschema.

Abb. 11a: Linearisierte Darstellung des Vektors Bluescript® II KS +/- im Bereich der MCS vor der Ligation. Die MCS wird von LacZ-Gen und Lac Promotor (grau unterlegt) flankiert. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoR V und BSSH II sind gekennzeichnet.

Abb. 11b: Als Insert dient das PCR-Amplifikat (Vα8+ TCRα).

Abb. 11c: Das PCR-Amplifikat ist ligiert, es liegt innerhalb der MCS.

MCS: multiple cloning site; UP: upper PCR-Primer; LP: lower PCR-Primer; LacZ: β-Galaktosidasegen

Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten ausplattiert und einer Hybridisierung mit Vα8- und Cα-spezifischen Primern (Vα8-Primer und Cα-Primer) unterzogen (s. Kap. 3.2.13). Einzelkolonien „positiver“ cDNA-Klone (=Klone, deren Plasmide die Vα8+ TCRα DNA integriert hatten) wurden in LB-Medium angezüchtet. Ihre Plasmide wurden durch alkalische Extraktion, zumeist mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen), isoliert und in je 15 µl H<sub>2</sub>O aufbewahrt (s. Kap. 3.2.16.2).

Zur Bestätigung der Integration des Vα8+ TCRα+ Inserts wurde ein Aliquot der Plasmide (1 µl) einem Verdau mit dem Restriktionsenzym BssH II unterzogen. BssH II schnitt den Vektor im Abstand von 33 bp bzw. 38 bp beidseits der MCS, in welcher das Insert integriert war (Abb. 13). Eine Agarosegelelektrophorese zeigte bei „positiven“ Klonen zwei DNA-Banden mit Längen von ca. 2800 bp (Vektor) und 360 bp (Insert).

Abb. 12 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von mit BssH II verdauten Plasmiden, die das V $\alpha$ 8+ TCR $\alpha$ + Insert integriert hatten.

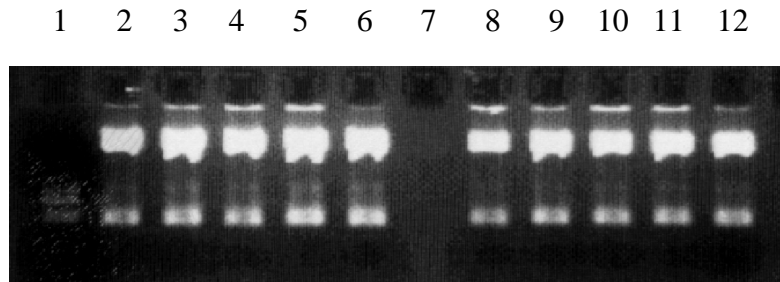


Abb. 12: Agarosegelelektrophorese von mit BssH II verdauten Plasmiden (nach Ligation und Transformation in Epicurian Coli XL1-Blue MRF' Bakterien).

Spur 1:  $\phi$ -Längenmarker.

Spuren 2 - 6 und 8 - 12: verdauten Plasmide.

Obere DNA-Bande: Vektor Bluescript® II KS +/- (2,8 kb), linearisiert.

Untere DNA-Bande: Insert (360 bp, V $\alpha$ 8+ TCR $\alpha$ ).

Spur 7: Negativkontrolle.

Erst nach Bestätigung des Vorliegens eines Inserts der erwarteten Größe (360 bp) erfolgte die Sequenzierung des Inserts. Die Sequenzierung erfolgte grundsätzlich in beide Richtungen, d. h. mit einem sense- und einem antisense-Primer. CCC- und NOR-Primer hybridisierten im Abstand von 3 bp bzw. 12 bp zum Insert in der MCS (Abb. 13).

sense-Primer: CCC-Primer: 5' TCG AGG TCG ACG GTA TC 3'

antisense-Primer: NOR-Primer: 5' CTT AAG GAC GTC GGG CCC CC 3'

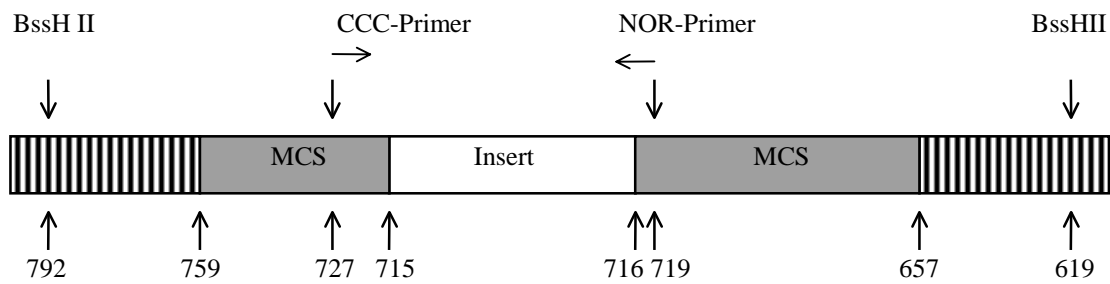


Abb. 13: Zur Sequenzierung des V $\alpha$ 8+ TCR $\alpha$  Inserts hybridisierten CCC- und NOR-Primer in der MCS des Vektors Bluescript<sup>®</sup> II KS +/- im Abstand von 12 bzw. 3 bp zum Insert. MCS: multiple cloning site

#### 4.2.3 Spezifität des mAk G177

120 Inserts wurden sequenziert, als einziges Mitglied der V $\alpha$ 8-Familie wurde V $\alpha$ 8.2 gefunden (s. Kap. 3.2.17). Dabei wurde V $\alpha$ 8.2 in annähernd voller Länge sequenziert (Giegerich et al., 1995). Einzige Ausnahme bildeten vier Inserts, die V $\alpha$ 4+ waren. Somit erkennt der mAk G177 nur ein Mitglied der V $\alpha$ 8-Familie, nämlich V $\alpha$ 8.2 (s. auch Diskussion).

#### 4.2.4 Nukleotidsequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen von 50 unabhängigen cDNA-Klonen RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ CD8 LEW T-Zellen

Die Nukleotidsequenzen und abgeleitete Aminosäuresequenzen der 50 ersten unabhängigen cDNA-Klone von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ CD8 LEW T-Zellen und neun Sequenzwiederholungen sind in Tab. 2 dargestellt. Dargestellt sind die ersten 59 Sequenzen, die gefunden wurden.

**RVA 21:**

04 TACTACTGTGCTGTGGA CGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 39 TACTACTGTGCTGTG AGGG GCTACCGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT- e)  
 29 TACTACTGTGCTGTGGAG GC CTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 42 TACTACTGTGCTGTGG C CTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 75 TACTACTGTGCTGTGG GGAA CTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT- \*)  
 66 TACTACTGTGCTGTGG GGAA CTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 68 TACTACTGTGCTGTGG GCTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 11 TACTACTGTGCTGTGGAGA T CTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 53 TACTACTGTGCTGTG TCCTCA TACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 120 TACTACTGTGCTGTGGAG G GCTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-  
 91 TACTACTGTGCTGTGGAGA TAG GCTACGGAAACAACAACTGATCTTTGGCTTGGGAACCATTTTGAGAGTCAGACCTTAT-

**RTJA1:**

55 TACTACTGTGCTGTGG G GGACTTCGTAAGCAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 58 TACTACTGTGCTGTGG GGC TCGTAAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 27 TACTACTGTGCT TT GGACTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 38 TACTACTGTGCT TT GGACTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT- \*)  
 32 TACTACTGTGCTGTGG C CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 14 TACTACTGTGCTGTGG CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 50 TACTACTGTGCTGTGG CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT- \*)  
 59 TACTACTGTGCTGTGG CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT- \*)  
 71 TACTACTGTGCTGTGG CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT- \*)  
 73 TACTACTGTGCTG C GGACTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 86 TACTACTGTGCTGTGG G CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-  
 65 TACTACTGTGCTGTGG G CTTCGTAACAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAAAT-

**RVA 25:**

57 TACTACTGTGCTGTGGA TT GCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTATGTCTCCCCAT- e)  
 56 TACTACTGTGCTGTGGAGA GCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTGTGTCTCCCCAT-  
 40 TACTACTGTGCTGTG AATAGCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTGTGTCTCCCCAT-  
 47 TACTACTGTGCTGTG AATAGCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTGTGTCTCCCCAT- \*)  
 60 TACTACTGTGCTGTGGA CG GCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTGTGTCTCCCCAT-  
 61 TACTACTGTGCTGTGGA TAGCTATGGCCAGGGAATAATCTTCGGTCTGGCTCCAGAGTATCTGTGTCTCCCCAT-

**RTJA10:**

08 TACTACTGTGCTG CGAGT TATGGAGGCAGTGGCAACAAGCTCATCTTTGGGACTGGCACTCTGCTTCTGTCAAGCCAAAT-  
 22 TACTACTGTGCTG CGAGT TATGGAGGCAGTGGCAACAAGCTCATCTTTGGGACTGGCACTCTGCTTCTGTCAAGCCAAAT- \*)  
 51 TACTACTGTGCTG CGAGT TATGGAGGCAGTGGCAACAAGCTCATCTTTGGGACTGGCACTCTGCTTCTGTCAAGCCAAAT- \*)  
 76 TACTACTGTGCTGTGGA TGGAGGCAGTGGCAACAAGCTCATCTTTGGGACTGGCACTCTGCTTCTGTCAAGCCAAAT-

**RVA56:**

18 TACTACTGTGCTGTGGA TACAGGAAACAACAAATACGTCTTTGGAGCAGGTACCAGACTGAAGGTTATACCACAT-  
 12 TACTACTGTGCTGTGGA TACAGGAAACAACAAATACGTCTTTGGAGCAGGTACCAGACTGAAGGTTATACCACAT- \*)  
 01 TACTACTGTGCTGTGG G TACAGGAAACAACAAATACGTCTTTGGAGCAGGTACCAGACTGAAGGTTATACCACAT-  
 37 TACTACTGTGCTGTGGAGA ATACAGGAAACAACAAATACGTCTTTGGAGCAGGTACCAGACTGAAGGTTATACCACAT-

**RTJA2:**

16 TACTACTGTGCTGGGGACACAATGCTAACAAAGTCATCTTCGGAAAGGGGACACGACTTCATGTTCTCCCTAAT-  
 43 TACTACTGTGCTGTGGTAAAAATGCTAACAAAGTCATCTTCGGAAAGGGGACACGACTTCATGTTCTCCCTAAT-  
 85 TACTACTGTGCTGCGGACACAATGCTAACAAAGTCATCTTCGGAAAGGGGACACGACTTCATGTTCTCCCTAAT-

**RVA15:**

46 TACTACTGTGCTG A TAATGCAGGTGCCAAGCTCACGTTTGGAGGGGGAACAAGGTTGACGGTCAAACCCCAT-  
 62 TACTACTGTGCTGTGGA TGCAGGTGCCAAGCTCACGTTTGGAGGGGGAACAAGGTTGACGGTCAAACCCCAT-  
 67 TACTACTGTGCTGTGGAG CTCC CAGGTGCCAAGCTCACGTTTGGAGGGGGAACAAGGTTGACGGTCAAACCCCAT-

**RTJA3:**

34 TACTACTGTGC CCTGACCTCGGGAGGAAACTACAAGCTTACGTTTGGAAAAGGGACCAGCCTTGTGGTTTACCCACAT-  
 44 TACTACTGTGCTGTGGAGA CCC CGGGAGGAAACTACAAGCTTACGTTTGGAAAAGGGACCAGCCTTGTGGTTTACCCACAT-

**TCRAV8.2-J1:**

45 TACTACTGTGT CACCTACGGAGCCAATAATAAGCTGACATTTGGGAAAGGAACGACTCTGAGCGTTATACCAGAT-  
 54 TACTACTGT GCTGTGTACTACGGAGCCAATAATAAGCTGACATTTGGGAAAGGAACGACTCTGAGCGAT-

**RTJA4:**

21 TACTACTGTGCTGTGG GCTTTGGGAGTGCCTGAAATTTGGACCTGGCACGAAAGTGATTGTCATACCATAT-  
 89 TACTACTGTGCTGTGG CCCC GCTTTGGGAGTGCCTGAAATTTGGACCTGGCACGAAAGTGATTGTCATACCATAT-

**RTJA6:**

17 TACTACTGTGCTGTGGAG CCCCCGGG TAACAACAATGCCCCACGATTTGGAGCAGGAACCAGACTAACAGTCAAACCAAAT-  
 25 TACTACTGTGCTGTGGA TAACAACAATGCCCCACGATTTGGAGCAGGAACCAGACTAACAGTCAAACCAAAT-

**RTJA5:** 41 TACTACTGTGCTGTGGAGATCTCGAGGGTACTGACAAAGTCATCTTTGGGACAGGGACCAGGTTACAAGTCTCACCAAAT-

**RTJA7:** 90 TACTACTGTGCT TACAGGAAAGTGGAGACAGACTCACCTTTGGGAAAGGAACTCAGCTGACCATCCAGCCCTAT-

**RTJA8:** 02 TACTACTGTGCTGTAGAGAGTGGAGGCTATAAACTGGTCTTTGGAAAGTGGGACTCGATTACTGGTGGAGCGCTGAT-

**RTJA9:** 87 TACTACTGTGCTGTGGCCGCTGGAGGAAGCTTTGCAAAGCCAACCTTCGGGAAAGGAACTAAACTCTCCATTAATCAAAT-

**RVA37:** 07 TACTACTGTGCTG CCATGTCT AATACGATAAGCTTTACTTCGGATCTGGCACCAAACCTCATTGTGAAGCCAAAT-

**RVA38:** 92 CACTACTGTGCCTCTAACAGCAATGCAGGCAAATTAACCTTTGGGGATGGGACCAGGCTCACAGTGAAGCCAAAT-

**RVA44:** 94 TACTACTGTGCTGTGGACGGGGCAGGGAACAGGCTCACTTTGGCAGAGGAACCAGGGTGAATCCGACCAGAT-

**RVA66:** 09 TACTACTGTGCTG C GGGCACTGGGTCTAAGCTGTCAATTTGGGAAAGGGAACGAAAGCTCACAGTGAAGTCTAGAT-

04	YYCA	VDGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
39	YYCA	VRGYRNKL	IFGLGTILSVRP	RVA21	e)	Y	VTDPE
29	YYCA	VEAYGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
42	YYCA	VAYGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
66	YYCA	VGNYGKLN	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
75	YYCA	VGNYGKLN	IFGLGTILRVRP	RVA21	*)	Y	VTDPE
68	YYCA	VGYNKLN	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
11	YYCA	VEISGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
53	YYCA	VSSYGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
120	YYCA	VEGYGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
91	YYCA	VEIGYGNKL	IFGLGTILRVRP	RVA21		Y	VTDPE
55	YYCA	VGDFVSNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
58	YYCA	VGLVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
27	YYCA	LDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
38	YYCA	LDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1	*)	N	VTDPE
32	YYCA	VAFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
14	YYCA	VDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
50	YYCA	VDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1	*)	N	VTDPE
59	YYCA	VDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1	*)	N	VTDPE
71	YYCA	VDFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1	*)	N	VTDPE
73	YYCA	ADFVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
65	YYCA	VGfVNNKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
86	YYCA	VGfVNDKL	TFGKGTQVVVIP	RTJA1		N	VTDPE
57	YYCA	VDCYQGI	IFGPGSRVSMSP	RVA25	e)	H	VTDPE
56	YYCA	VESYGQGI	IFGPGSRVSVSP	RVA25		H	VTDPE
40	YYCA	VNSYGQGI	IFGPGSRVSVSP	RVA25		H	VTDPE
47	YYCA	VNSYGQGI	IFGPGSRVSGSP	RVA25	*)	H	VTDPE
60	YYCA	VDGYQGI	IFGPGSRVSVSP	RVA25		H	VTDPE
61	YYCA	VDSYGQGI	IFGPGSRVSVSP	RVA25		H	VTDPE
08	YYCA	ASYGSGNKL	IFGTGTL <sup>S</sup> VKVP	RTJA10		N	VTDPE
22	YYCA	ASYGSGNKL	IFGTGTL <sup>S</sup> VKVP	RTJA10	*)	N	VTDPE
51	YYCA	ASYGSGNKL	IFGTGTL <sup>S</sup> VKVP	RTJA10	*)	N	VTDPE
76	YYCA	VDGGSGNKL	IFGTGTL <sup>S</sup> VKVP	RTJA10		N	VTDPE
18	YYCA	VD <sup>T</sup> GNKY	VFGAGTRLKVIP	RVA56		H	VTDPE
12	YYCA	VD <sup>T</sup> GNKY	VFGAGTRLKVIP	RVA56	*)	H	VTDPE
37	YYCA	VENTGNKY	VFGAGTRLKVIP	RVA56		H	VTDPE
01	YYCA	VGTGNKY	VFGAGTRLKVIP	RVA56		H	VTDPE
16	YYCA	GDTNAKV	IFGKGTRLHVLP	RTJA2		N	VTDPE
43	YYCA	VVKNANKV	IFGKGTRLHVLP	RTJA2		N	VTDPE
85	YYCA	ADTNANKV	IFGKGTRLHVLP	RTJA2		N	VTDPE
46	YYCA	DNAGAKL	TFGGGTRLTVKP	RVA15		H	VTDPE
62	YYCA	VDAGAKL	TFGGGTRLTVKP	RVA15		H	VTDPE
67	YYCA	VELPGAKL	TFGGGTRLTVKP	RVA15		H	VTDPE
34	YYCA	LTSGGNYKL	TFGKG <sup>T</sup> SLVVHP	RTJA3		H	VTDPE
44	YYCA	VETPGGNYKL	TFGKG <sup>T</sup> SLVVHP	RTJA3		H	VTDPE
45	YYCV	TYGANNKL	TFGKG <sup>T</sup> TLSVIP	TCRAV8.2-J1		D	VTDPE
54	YYCA	VYYGANNKL	TFGKG <sup>T</sup> TLS	TCRAV8.2-J1		D	VTDPE
21	YYCA	VGFGSAL	KFGPGTKVIVIP	RTJA4		Y	VTDPE
89	YYCA	VAPFGSAL	KFGPGTKVIVIP	RTJA4		Y	VTDPE
17	YYCA	VEPPGNNAP	RFGAGTRLTVKP	RTJA6		N	VTDPE
25	YYCA	VDNNNAP	RFGAGTRLTVKP	RTJA6		N	VTDPE
41	YYCA	VEISRGTDKV	IFGTGTRLQVSP	RTJA5		N	VTDPE
90	YYCA	YTGS <sup>G</sup> DRL	TFGKG <sup>T</sup> QLTIQP	RTJA7		Y	VTDPE
02	YYCA	VESGGYKL	VFGSGTRLLVSA	RTJA8		D	VTDPE
87	YYCA	VAAGGSFAKP	TFGKG <sup>T</sup> TKLSIKS	RTJA9		N	VTDPE
07	YYCA	AMSNYDKL	YFGSGTKLIVKP	RVA37		N	VTDPE
92	YCAS	NSNAGKL	TFGDGTRLTVKP	RVA38		N	VTDPE
94	YYCA	VDGAGNRL	TFGRGTRVLIRP	RVA44		D	VTDPE
09	YYCA	AGTGSKL	SFGKG <sup>T</sup> TKLTVSL	RVA66		D	VTDPE
	Klon-Nr.	V $\alpha$ 8.2	CDR3 $\alpha$	J $\alpha$	(J $\alpha$ )		C $\alpha$

Tab. 2

Tab. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenzen der ersten 59 V $\alpha$ 8.2+ TCR $\alpha$ -Transkripte aus RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (50 unabhängige cDNA-Klone).

\*) Sequenzwiederholung; e): Unterschied zu bezeichnetem J $\alpha$  von 1 Nukleotid bzw. 1 AS, wahrscheinlich aufgrund eines PCR-Fehlers. J $\alpha$ -Bezeichnungen nach Giegerich et al., 1995 (TCRAV8.2-J1), Shirwan et al., 1993 und 1995 (RVA) und Hinkkanen et al., 1993.

S. 78: Nukleotidsequenzen von Tyrosin-88 (TAC) des V $\alpha$ 8.2 bis zur ersten AS (AT-) des 5' kodierenden C $\alpha$  Endes. Erster Abstand nach 3' Ende des V $\alpha$ 8.2; 2. Abstand nach evtl. vorhandenen N-Nukleotiden; 3. Abstand nach 3' Ende des J $\alpha$  (AT-).

Fett gedruckt: Name des TCR V $\alpha$ -Segments. Kursiv: Nummer des cDNA-Klons.

S. 79: Abgeleitete Aminosäuresequenzen von Tyrosin-88 (V $\alpha$ 8.2) bis zum 5' C $\alpha$ . CDR3 $\alpha$  von Position 93 bis zum konservierten Leucin zwei Positionen vor dem konservierten FGXG-Motiv des J $\alpha$  (Definition nach Fields et al., 1995).

#### 4.2.5 Erstbeschreibung von zehn TCR J $\alpha$ -Segmenten der LEW Ratte

Die Nukleotidsequenzen von 10 zuvor nicht beschriebenen J $\alpha$ -Segmenten, im folgenden RTJA1 - 10 genannt, wurden in RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen auf cDNA-Ebene bestimmt (Tab. 3). Basierend auf Homologien zu J $\alpha$ -Genen der Maus wurde die genomische Lage der J $\alpha$ -Gene der Ratte vorausgesagt (Koop et al., 1994). Wurden identische TCR J $\alpha$ -Nukleotidsequenzen in mindestens drei unabhängigen cDNA-Klonen (unterschiedliche CDR3 $\alpha$ -Regionen, unterschiedliche N-Nukleotide) gefunden, konnte durch Vergleich ihrer 5' Enden das 5' kodierende Ende des TCR J $\alpha$ -Segmentes abgeschätzt werden. Sequenzen, bei denen das 5' Ende auf diese Weise abgeschätzt wurde, sind in Tab. 3 unterstrichen.

RTJA1 (Klon 27):  
 TACTACTGTGCT TT GGACTTCGTAAACAACAACTTACTTTTGGGAAGGGAACCCAAGTGGTAGTGATACCAA AT-  
 RTJA2 (Klon 16):  
 TACTACTGTGCTG G GGACACAAATGCTAACAAAGTCATCTTCGGAAAGGGGACACGACTTCATGTTCTCCCTA AT-  
 RTJA3 (Klon 34):  
 TACTACTGTGC CCTGACCTCGGGAGGAAACTACAAGCTTACGTTTGGAAAAGGGACCAGCCTTGTGGTTCATCCAC AT-  
 RTJA4 (Klon 89):  
 TACTACTGTGCTGTGG CCCCA GGCTTTGGGAGTGCCTGAAATTTGGACCTGGCAGGAAAGTGATTGTGCATACCAT AT-  
 RTJA5 (Klon 41):  
 TACTACTGTGCTGTGGAGA TCTCGAGGGGTACTGACAAAGTCATCTTTGGGACAGGGACCAGGTTACAAGTCTCACCAA AT-  
 RTJA6 (Klon 17):  
 TACTACTGTGCTGTGGAG CCCCCGGG TAACAACAATGCCCCACGATTTGGAGCAGGAACCAGACTAACAGTCAAACCAA AT-  
 RTJA7 (Klon 90):  
 TACTACTGTGCT TATACAGGAAGTGGAGACAGACTCACCTTTGGGAAAGGAACTCAGCTGACCATCCAGCCCT AT-  
 RTJA8 (Klon 02):  
 TACTACTGTGCTGT AGAGAGTGGAGGCTATAAACTGGTCTTTGGAAGTGGGACTCGATTACTGGTGAGCGCTG AT-  
 RTJA9 (Klon 87):  
 TACTACTGTGCTGTGG CCGCTGGAGGAAGCTTTGCAAAGCCAACCTTCGGGAAAGGAACTAAACTCTCCATTAATCAA AT-  
 RTJA10 (Klon 08):  
 TACTACTGTGCTG CGAGT TATGGAGGCAGTGGCAACAAGCTCATCTTTGGGACTGGCACTCTGCTTTCTGTCAAGCCAA AT-

5' V $\alpha$ 8.2 (N-Nukl.)  $\longleftarrow$  J $\alpha$   $\longrightarrow$  C $\alpha$  3'

RTJA	Klon	AS-Sequenz von Tyr-88 bis 5' C $\alpha$	Maus J $\alpha$ <sup>a</sup>
		V $\alpha$ 8.2	
		CDR3 $\alpha$	
		J $\alpha$	
		C $\alpha$	
RTJA1	27	YYCAL <u>DFVNNKL</u> TFGKGTQVVVIP N	TCRAJ7
RTJA2	16	YYCAG <u>DTNAKV</u> IFGKGTSLVHP N	TCRAJ30
RTJA3	34	YYCAL <u>TSGGNYKL</u> TFGKGTSLVVHP H	TCRAJ6
RTJA4	89	YYCAV <u>APGFGSAL</u> KFGPGTKVIVIP Y	TCRAJ35
RTJA5	41	YYCAV <u>EISRGTDKV</u> IFGTGTRLQVSP N	TCRAJ34
RTJA6	17	YYCAV <u>EPPGNNAP</u> RFGAGTRLTVKP N	TCRAJ56
RTJA7	90	YYCAY <u>TGSGDRL</u> TFGKGTQLTIQP Y	TCRAJ45
RTJA8	02	YYCAV <u>ESGGYKL</u> VFGSGTRLLVSA D	TCRAJ12
RTJA9	87	YYCAV <u>AAGGSFAKP</u> TFGKGTKLSIKS N	TCRAJ22
RTJA10	08	YYCAA <u>SYGGSGNKL</u> IFGTGTLVSVKP N	TCRAJ32

<sup>a</sup> nach Koop et al., 1994

Tab. 3: RTJA1 - RTJA10: Erstbeschreibung von zehn TCR J $\alpha$ -Segmenten der LEW Ratte auf cDNA-Ebene. Bei sechs J $\alpha$ -Segmenten konnte durch Vergleich von mindestens drei unabhängigen cDNA-Klonen das genomische 5' kodierende J $\alpha$ -Ende abgeschätzt werden (unterstrichene Sequenzabschnitte).

*oben:* Nukleotidsequenzen von Tyrosin-88 (TAC) des V $\alpha$ 8.2 bis zur ersten AS (AT-) des 5' kodierenden C $\alpha$ -Endes. 1. Abstand nach 3' Ende des V $\alpha$ 8.2; 2. Abstand nach evtl. vorhandenen N-Nukleotiden; 3. Abstand nach 3' Ende des J $\alpha$  (AT-).

*unten:* Abgeleitete Aminosäuresequenzen von Tyrosin-88 (V $\alpha$ 8.2) bis zur ersten AS des 5' Endes von C $\alpha$ . Kursiv: CDR3 $\alpha$ -Schleife. Die AS von Position 93 bis zum konservierten Leucin zwei Positionen vor dem konservierten FGXG-Motiv des J $\alpha$  wurden als CDR3 $\alpha$  definiert (Definition nach Fields et al., 1995).

#### 4.2.6 Selektiver J $\alpha$ -Gebrauch RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen

Ca. 50 J $\alpha$  Segmente der Ratte wurden auf cDNA-Ebene identifiziert (Torres-Nagel et al., 1996 und 1998). Um abzuschätzen, ob einzelne J $\alpha$ -Segmente von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen überrepräsentiert werden, wurde angenommen, daß (wie auch bei Mensch und Maus) ca. 50 J $\alpha$ -Segmente für das TCR-Rearrangement bei der Ratte zur Verfügung stehen. Die statistische Wahrscheinlichkeit p, daß ein bestimmtes J $\alpha$ -Segment in 50 unabhängigen cDNA-Klonen bei Normalverteilung nicht zufällig verwendet wird, beläuft sich bei n-facher Wiederholung der J $\alpha$ -Sequenz auf folgende Werte (Kolmogoroff-Smirnoff-Test, s. Kap. 3.3):

n	p
3	0,34%
4	37,04%
5	84,78%
6	97,62%
$\geq 7$	$\geq 99,69\%$

Die 50 zuerst gefunden, unabhängigen in-frame Sequenzen der cDNA-Klone von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ Blasten enthielten 19 verschiedene J $\alpha$ -Gensegmente. Die J $\alpha$ -Gene RVA21, RTJA1 und RVA25 (Shirwan et al., 1993) wurden von 10, 8 bzw. 5 cDNA-Klonen benutzt (s. Diagramm 1). 46% der Klone benutzten eines von nur drei verschiedenen J $\alpha$ -Segmenten, 64% der Klone eines von sechs J $\alpha$ -Segmenten. Da Wiederholungen identischer TCR $\alpha$ -Ketten (identische Nukleotidsequenzen auch in der CDR3 $\alpha$ -Region, identische N-Nukleotide) nicht in die Analysen eingingen, spiegeln diese Zahlen nicht das Ausmaß von klonaler Expansion alloreaktiver Zellen wider. Ein J $\alpha$ -Segment wurde 10x (RVA21), ein weiteres 8x (RTJA1) exprimiert. Somit sind mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\geq 99,69\%$  die J $\alpha$ -Segmente von 18 der 50 unabhängigen cDNA-Klone nicht zufällig gewählt, Normalverteilung vorausgesetzt.



Es bestand keine Korrelation des J $\alpha$ -Gebrauchs mit der genomischen Lokalisation der TCR J $\alpha$ -Gene, die basierend auf Homologien zu Maus TCR J $\alpha$ -Genen vorausgesagt wurde (Koop et al., 1994). RVA21 entspricht J47 der Maus und liegt somit im 5' Bereich des J $\alpha$ -Locus, RTJA1 entspricht Maus J7, liegt also am 3' Ende des J $\alpha$ -Locus, und RVA25, Maus J26 entsprechend, liegt zentral. 25 der 50 gefundenen J $\alpha$ -Gene liegen 3' vom zentralen Maus J33, und 25 liegen 5' von Maus J33. Die vermutete genomische Position der J $\alpha$  Segmente ist ebenfalls in Diagramm 1 dargestellt.

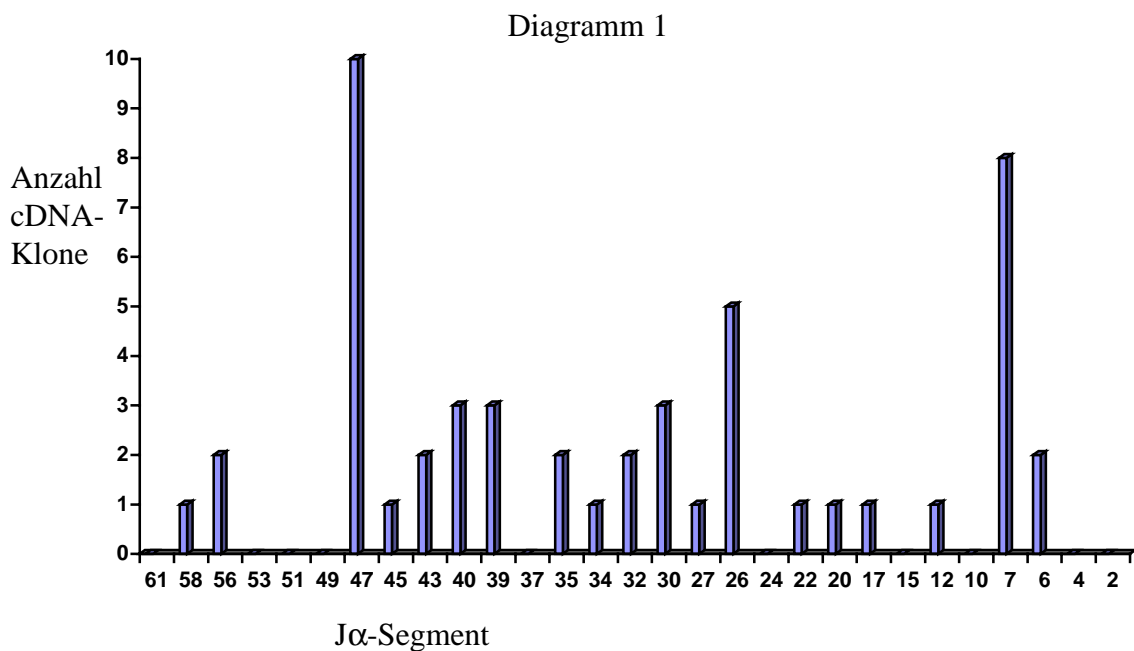


Diagramm 1: J $\alpha$ -Gebrauch RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen. Die Balken repräsentieren die Anzahl unabhängiger cDNA-Klone (insgesamt 50), die dasselbe J $\alpha$  Segment exprimieren. Die J $\alpha$ -Segmente sind gemäß der genomischen Organisation, wie sie basierend auf Homologien zu J $\alpha$ -Genen der Maus vorausgesagt wurde (Koop et al., 1994), auf der Abszisse angeordnet.

#### 4.2.7 Keimbahnsequenz des 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2

Die Kenntnis der Keimbahnsequenz des 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2 war Voraussetzung zur Bestimmung der Anzahl von N-Nukleotiden im V $\alpha$ /J $\alpha$ -Übergangsbereich (s. Kap. 4.2.9).

In der Keimbahn befinden sich direkt angrenzend an das genomische 3' kodierende Ende von TCR V $\alpha$  sowie an das 5' kodierende Ende von TCR J $\alpha$  bei Mensch und Nager konservierte, nicht-kodierende Sequenzblöcke (Abb. 14). Dabei handelt es sich um:

- 1.) „Heptamer“ (sieben Nukleotide)
- 2.) „Nonamer“ (neun Nukleotide)
- 3.) „Spacer“-DNA (12 oder 23 Nukleotide)

Heptamer und Nonamer, die vermutlich von Rekombinationsenzymen erkannt werden, werden als Rekombinationssignalsequenzen bezeichnet und sind streng konserviert. Die stets zwischen Heptamer und Nonamer liegende Spacer-DNA ist weniger streng konserviert.

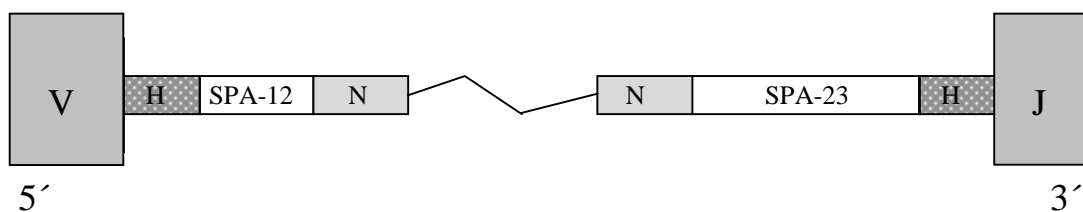


Abb. 14: Nicht-kodierende, konservierte Heptamer- und Nonamersequenzblöcke (= Rekombinationssignalsequenzen) flankieren 3' kodierendes Ende der V $\alpha$ -Gene und 5' kodierendes Ende der J $\alpha$ -Gene. Immer liegt eine nicht-kodierende Spacer-DNA (12 oder 23 Nukleotide) zwischen Heptamer und Nonamer.

H: Heptamer; N: Nonamer; SPA: Spacer-DNA; V: TCR V $\alpha$ -Segment; J: TCR J $\alpha$ -Segment

Genomische DNA wurde aus der Ohrmuschel einer 6 Wochen alten LEW Ratte präpariert (s. Kap. 3.2.18) und einer PCR unterworfen. Als PCR-Primer wurden Hepta- bzw. Nona-Primer und Sal 166-Primer verwendet (30 Zyklen, 95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min).

antisense-Primer

Hepta-Primer: 5' GCA GTC TCC CTC ACT GTG 3'

Nona-Primer: 5' GGT TCA TGT GCA GCT TCC 3'

Diese Primer wurden komplementär zu Nonamer- bzw. Heptamersequenz und einigen anschließenden Nukleotiden der Spacer-Sequenz der AV8-Genfamilie der C57Bl/6 Maus hergestellt (Holman et al., 1993; Abb. 15).

sense-Primer

Sal 166-Primer: 5' GGG TCG ACA GAA GGC CTG GTC AGT CT 3'

(Spezifität: TCR V $\alpha$ 8.2 der Ratte; Giegerich et al., 1995)

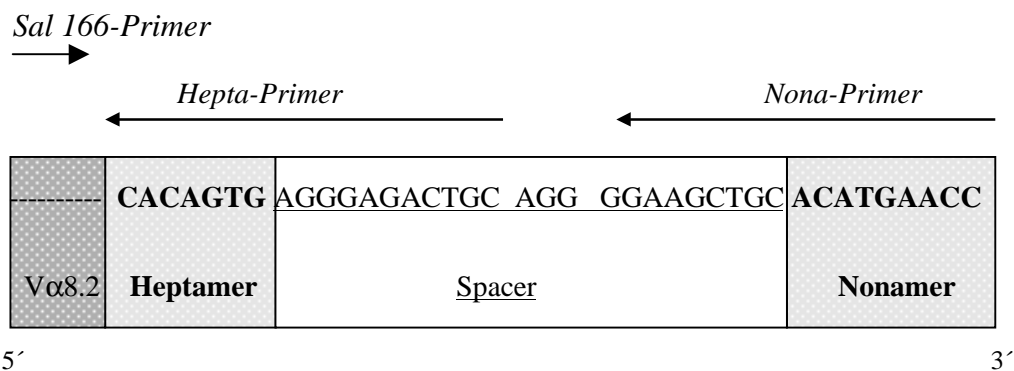


Abb. 15: Hybridisierung von Sal 166-, Hepta- und Nona-Primer. Sequenzierung des genomischen 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2.

Das PCR-Produkt wurde gereinigt und sequenziert (s. Kap. 3.2.16 und 3.2.17). Als Sequenzierungsprimer wurden erneut Sal 166- und Nona- bzw. Hepta-Primer eingesetzt. Gelelektrophoretisch konnte ein PCR-Amplifikat der erwarteten Größe (ca. 250 bp) nachgewiesen werden (Abb. 16). Mit Hepta- und Nona-Primer wurde das genomische 3' kodierende Ende von V $\alpha$ 8.2 amplifiziert und sequenziert. Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2 zeigt Abb. 17.

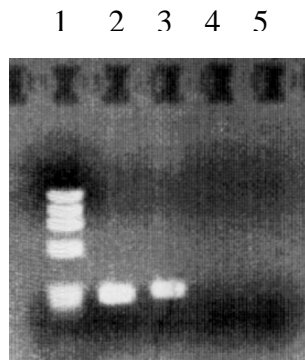


Abb. 16: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate des genomischen 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2 (LEW Ratte).

Spur 1:  $\phi$ -Längenmarker.

Spur 2: PCR-Amplifikat nach PCR mit Hepta- und Sal 166-Primer.

Spur 3: PCR-Amplifikat nach PCR mit Nona- und Sal 166-Primer.

Spur 4: Negativkontrolle (PCR mit Hepta- und Sal 166-Primer, keine DNA).

Spur 5: Negativkontrolle (PCR mit Nona- und Sal 166-Primer, keine DNA).

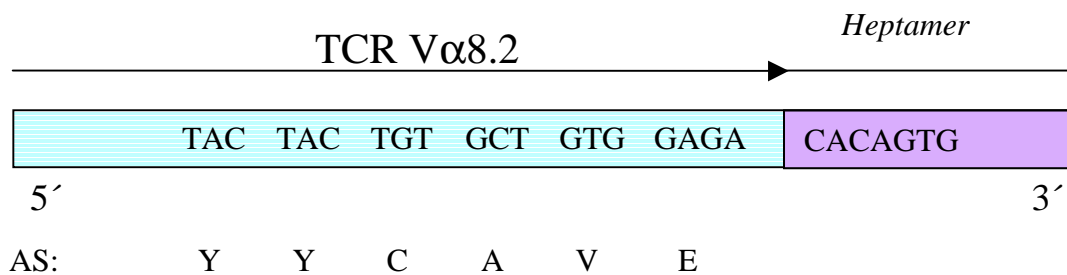


Abb. 17: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des genomischen 3' kodierenden Endes von TCR V $\alpha$ 8.2 (LEW Ratte).

#### 4.2.8 Komposition der CDR3 $\alpha$ -Region RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen

Zur Identifizierung von Strukturen, die die RT1A<sup>f</sup>-Erkennung des TCR begünstigen könnten, wurden die Aminosäuresequenzen der CDR3 $\alpha$ -Regionen von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen, die eines der drei am häufigsten gefundenen J $\alpha$ -Segmente verwendeten, miteinander verglichen (Abb. 18). Diese drei J $\alpha$ -Segmente wurden in 23 von 50 unabhängigen TCR $\alpha$ -Transkripten aus RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen gefunden (s. Kap. 4.2.6).

20 dieser 23 CDR3 $\alpha$ -Sequenzen besitzen folgendes Motiv:

(hydrophob)-hydrophob-G/N-N/Q-K/G-I/L

Es befindet sich ein Glycin (G)- oder ein Asparagin (N)-Rest im Zentrum der CDR3 $\alpha$ -Region zwischen einer oder zwei ungeladenen Aminosäuren (V: Valin, F: Phenylalanin; Y: Tyrosin), von denen eine aromatisch ist (Phenylalanin, Tyrosin), an der V-proximalen Seite und einer amphiphilen Aminosäure mit einer ungeladenen, polaren Amidgruppe, nämlich Asparagin (N) oder Glutamin (Q), an der C-proximalen Seite (I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin).

V $\alpha$ 8.2	CDR3 $\alpha$	J $\alpha$
V	D <b>GN</b> KL	RVA21
V	R <b>GYR</b> NKL	RVA21 *
V	E <b>AYGN</b> KL	RVA21
V	<b>AYGN</b> KL	RVA21
V	<b>GNYGN</b> KL	RVA21
V	<b>GYGN</b> KL	RVA21
V	E <b>ISGN</b> KL	RVA21
V	<b>SSYGN</b> KL	RVA21
V	E <b>GYGN</b> KL	RVA21
V	E <b>IGYGN</b> KL	RVA21
V	G <b>DFVSN</b> KL	RTJA1
V	GL <b>VNN</b> KL	RTJA1
L	D <b>FVNN</b> KL	RTJA1
V	A <b>FVNN</b> KL	RTJA1
V	D <b>FVNN</b> KL	RTJA1
A	D <b>FVNN</b> KL	RTJA1
V	G <b>FVNN</b> KL	RTJA1
V	G <b>FVND</b> KL	RTJA1
V	DC <b>YGQGI</b>	RVA25 *
V	ES <b>YGQGI</b>	RVA25
V	NS <b>YGQGI</b>	RVA25
V	DG <b>YGQGI</b>	RVA25
V	DS <b>YGQGI</b>	RVA25

Abb. 18: CDR3 $\alpha$ -Kompositionen von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen. Abgeleitete Aminosäuresequenzen der CDR3 $\alpha$  Regionen der 23 unabhängigen TCR V $\alpha$ 8.2+ cDNA-Klone, die eines der drei am häufigsten gefundenen J $\alpha$ -Segmente benutzten. Die AS von Position 93 bis zum konservierten Leucin zwei Positionen vor dem konservierten FGXG-Motiv (J $\alpha$ ) wurden als CDR3 $\alpha$  definiert (Fields et al., 1995). Fett gedruckt ist das Motiv der CDR3 $\alpha$ -Region: (hydrophob)-hydrophob-G/N-N/Q-K/G-I/L.

\* Dieser Klon unterschied sich von RVA21 nach Shirwan et al. (1993) in einem Nukleotid, wahrscheinlich aufgrund eines PCR-Fehlers.

#### 4.2.9 Anzahl der N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Regionen RT1f-alloreaktiver TCR V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen

Die Anzahl der N-Nukleotide, die während des Rearrangements in der CDR3 $\alpha$ -Region (zwischen TCR V $\alpha$ 8.2 und TCR J $\alpha$ ) eingefügt werden, wurde bestimmt. Diese Anzahl sollte mit den N-Nukleotiden der CDR3 $\alpha$ -Schleife von V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F und unstimulierten V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen verglichen werden (Torres-Nagel et al., 1997; s. Diskussion). Dazu wurde durch Vergleich der J $\alpha$ -Sequenzen von mindestens drei unabhängigen cDNA-Klonen (identisches J $\alpha$ , unterschiedliche CDR3 $\alpha$ -Regionen) das genomische 5' kodierende Ende der J $\alpha$ -Gene abgeschätzt. Neben neu beschriebenen (RTJA1 - 10, s. Kap. 4.2.5) wurden TCR J $\alpha$ -Sequenzen von Giegerich et al. (1995), Hinkkanen et al. (1993) und Shirwan et al. (1993 und 1995) zum Vergleich hinzugezogen. Je größer die Mindestanzahl  $n'$  der unabhängigen cDNA-Klone mit gleichem J $\alpha$ , deren J $\alpha$ -Gene miteinander verglichen wurden, gewählt wurde, desto genauer konnte die Bestimmung der genomischen 5' kodierenden Enden dieser J $\alpha$ -Gene und damit der Anzahl der N-Nukleotide erfolgen. Das genomische 3' kodierende Ende von TCR V $\alpha$ 8.2 war bereits bekannt (s. Kap. 4.2.7).

Für  $n' = 3$  fanden wir, daß 41 unabhängige cDNA-Klone durchschnittlich jeweils 1,80 N-Nukleotide im V $\alpha$ /J $\alpha$ -Übergangsbereich verwendeten (s. Diagramm 2a). Für  $n' = 4$  fanden wir, daß 35 unabhängige cDNA-Klone durchschnittlich 1,46 N-Nukleotide verwendeten (s. Diagramm 2b). 34% der cDNA-Klone verwendeten keine N-Nukleotide im V $\alpha$ /J $\alpha$ -Übergangsbereich ( $n' = 3$  und  $n' = 4$ ).

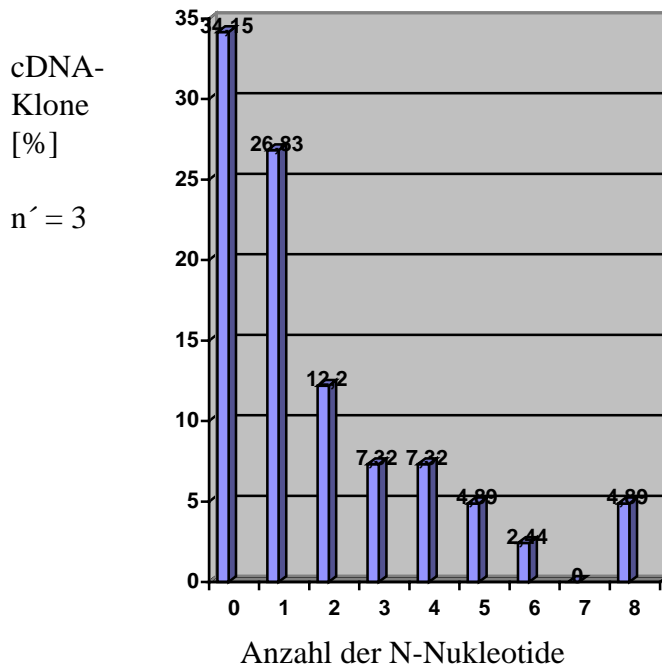


Diagramm 2a

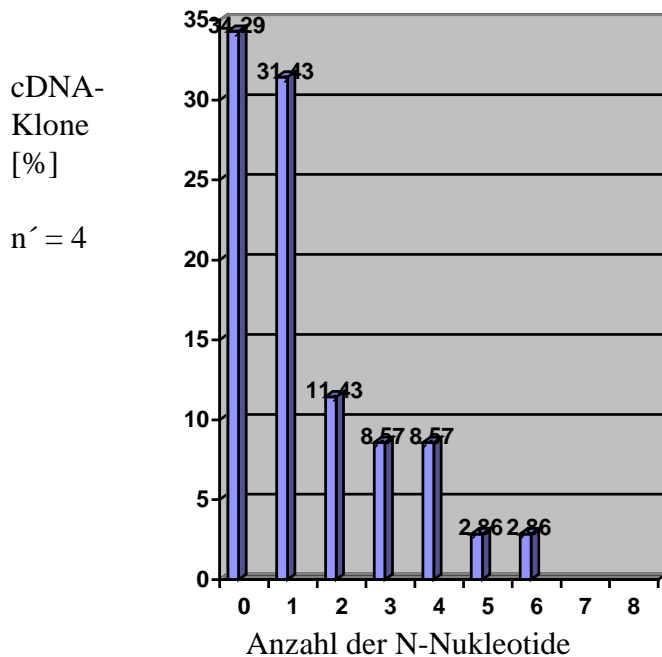


Diagramm 2b

Diagramm 2: Anzahl der N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Regionen RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen.

Die Balken repräsentieren die Frequenz unabhängiger cDNA-Klone mit einer bestimmten Anzahl von N-Nukleotiden. Abszisse: Anzahl der N-Nukleotide. Das 3' kodierende Ende von TCRVA8.2 in der Keimbahn war bekannt.

Diagramm 2a: Analyse von 41 cDNA-Klonen.

Diagramm 2b: Analyse von 35 cDNA-Klonen.

n': Mindestanzahl der unabhängigen cDNA-Klone mit gleichem J $\alpha$ , deren J $\alpha$ -Gene zur Identifizierung des genomischen 5' kodierenden TCR J $\alpha$ -Endes miteinander verglichen wurden.



#### 4.2.10 CDR3 $\alpha$ -Längen RT1f-alloreaktiver V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen

Die CDR3 $\alpha$ -Schleife beginnt gemäß Röntgenstrukturanalysen bei Position 93 (Cystin = Position 90 des V $\alpha$ 8.2) und endet nach dem weniger streng konservierten Leucin zwei Positionen vor dem streng konservierten FGXG-Motiv des J $\alpha$ -Segments (Definition nach Fields et al., 1995).

Die CDR3 $\alpha$ -Längen von 50 unabhängigen TCR $\alpha$ -Transkripten aus RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen zeigt Diagramm 3. 58% der CDR3 $\alpha$ -Ketten bestehen aus sieben AS. Der Mittelwert der CDR3 $\alpha$ -Längen (L) beträgt 7,06 AS, die Standardabweichung (s) beträgt 0,89.

Die Variabilität der CDR3 $\alpha$ -Längen erscheint gering (s. Diskussion). Achtzehn der 23 cDNA-Klone, die eines der drei von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen bevorzugten J $\alpha$ -Segmente verwenden (s. Kap. 4.2.6), besitzen eine CDR3 $\alpha$ -Kette von sieben AS, eine CDR3 $\alpha$ -Kette bestand aus fünf AS, zwei aus sechs AS und zwei weitere aus acht AS (Abb. 18).

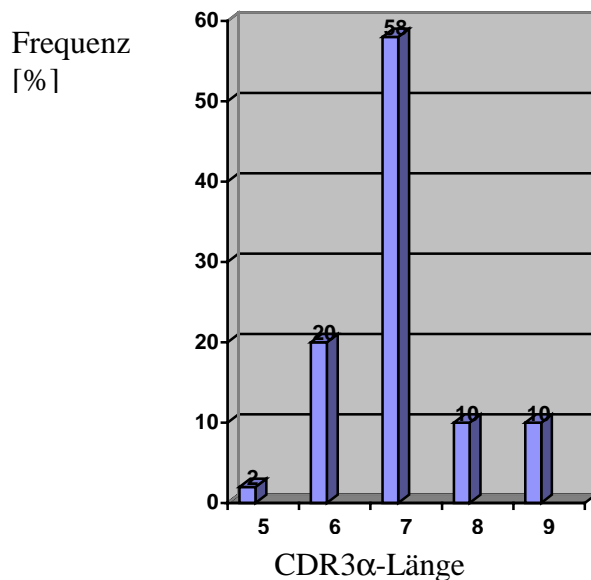


Diagramm 3

Diagramm 3: Verteilung der CDR3 $\alpha$ -Längen (Anzahl der AS) von 50 unabhängigen TCR $\alpha$ -Transkripten aus RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen. Die Balken repräsentieren die Frequenz von cDNA-Klonen mit CDR3 $\alpha$ -Schleifen gleicher Länge. /Definition des CDR3 $\alpha$  nach Fields et al., 1995.)

### 4.3 V $\beta$ -Repertoire

#### 4.3.1 Durchflußzytometrische Analyse des V $\beta$ -Repertoires RT1f-alloreaktiver LEW CD8 T-Zellen

Bei allogener Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen RT1f-negativer Rattenstämme mit RT1A<sup>f</sup> expandieren bevorzugt TCR V $\alpha$ 8.2<sup>+</sup> (mAk G177<sup>+</sup>) T-Zellklone (Torres-Nagel et al., 1994). Um zu untersuchen, ob diese V $\alpha$ 8.2-vermittelte Alloreaktivität von einer Paarung der V $\alpha$ 8.2-Ketten mit bestimmten TCR V $\beta$ -Segmenten abhängt, wurde das TCR V $\beta$ -Repertoire von G177<sup>+</sup> und G177<sup>-</sup> RT1f-alloreaktiven T-Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

$2 \times 10^8$  LEW LK-Zellen wurden isoliert (Nylonwollfiltration, B- und CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion im MACS<sup>®</sup>; s. Kap. 3.1.2 und 3.1.3). Anschließend wurden die LK-Zellen als responder-Zellen in eine viertägige MLR eingesetzt und so mit RT1A<sup>f</sup> allogenen stimuliert (s. Kap. 3.1.7; Stimulatorzellen: dendritische Zellen von LEW.1F). Nach der MLR waren 9,4% der LK-Zellen V $\alpha$ 8.2<sup>+</sup> (mAk G177<sup>+</sup>) und 95,9% CD8 $\beta$ <sup>+</sup> (mAk 341<sup>+</sup>), wie durchflußzytometrisch ermittelt wurde (nicht gezeigt). Nun wurde die Expression verschiedener V $\beta$ -Gensegmente, nämlich V $\beta$  8.2, 8.5, 10 und 16, der G177<sup>+</sup> Blasten analysiert. Diese vier V $\beta$ -Segmente sind an der Bildung von ca. 25% der TCR peripherer CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt (Torres-Nagel et al., 1993 und 1997).

Es ließen sich nur geringfügige Unterschiede im TCR V $\beta$ -Repertoire der RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2<sup>+</sup> und RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8<sup>-</sup> Populationen aufdecken (Tab. 4). V $\beta$ 8.2 wurde um den Faktor 1,7 häufiger auf G177<sup>+</sup> LEW T-Zellen gefunden, V $\beta$ 16 bevorzugte um den Faktor 1,7 die G177<sup>-</sup> LEW T-Zellen (Tab. 4, s. auch Kap. 4.3.2 und Diskussion).

	Vβ8.2+	Vβ8.5+	Vβ10+	Vβ16+
<b>(1) LEW CD8 T-Zellen (allor. insgesamt)</b>	5,45%	10,99%	3,38%	8,36%
<b>(2) Vα8.2+ LEW CD8 T-Zellen (alloreaktiv)</b>	8,74%	12,38%	3,34%	5,19%
<b>(3) Vα8.2- LEW CD8 T-Zellen (alloreaktiv)</b>	5,14%	10,86%	3,39%	8,64%
<b>(4) Total LEW.1F CD8 T-Zellen*</b>	4,3%*	7,0%*		7,2%*
<b>(5) Vα8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen*</b>	6,0%*	4,7%*		7,6%*
<b>(6) Quotient (2) : (3)</b>	1,70:1	1,14:1	1:1,01	1:1,66
<b>(7) Quotient (2) : (1)</b>	1,60:1	1,13:1	0,99:1	1:1,61

Tab. 4:

Zeilen 1 - 3: FACS-Analyse des TCR Vβ-Repertoires RT1f-alloreaktiver LEW T-Zellen (95,9% CD8β+; 9,4% Vα8.2+; nach Stimulation mit RT1A<sup>f</sup>). Die Expression einzelner Vβ-Gene zwischen den Zellpopulationen Vα8.2+ und Vα8.2- T-Zellen bzw. T-Zellen insgesamt unterscheidet sich nicht stärker als um den Faktor 1,7 (Vβ8.2 und Vβ16).

Zeilen 4 und 5: TCR Vβ-Expression von LEW.1F CD8 T-Zellen.

Zeilen 6 und 7: Verhältnisse RT1f-alloreaktiver LEW CD8 Blastenpopulationen.

\*: nach Torres-Nagel et al., 1997

#### 4.3.2 RT1f-spezifische Alloreaktivität und RT1f-abhängige positive Selektion von Vα8.2+ CD8 T-Zellen sind nicht abhängig von der Paarung mit bestimmten Vβ-Segmenten (semiquantitative PCR)

14,1% der CD8 T-Zellen des Rattenstamms LEW.1F (RT1f-spezifisch im Thymus selektierte T-Zellen) sind Vα8.2+ (mAk G177+), während nur ca. 2% der CD8 T-Zellen RT1f-negativer Lewis Rattenstämme (Haplotypen 1, a, c d, k, n, u) Vα8.2+ sind. CD4 T-Zellen dieser Rattenstämme (RT1f+ oder RT1f-) sind zu 1 - 2% Vα8.2+ (Torres-Nagel et al., 1994).

Um zu untersuchen, ob der Beitrag von TCR Vα8.2 zu RT1f-spezifischer positiver Selektion von Thymozyten und Alloreaktivität von der Paarung mit bestimmten Vβ-Segmenten abhängig ist, wurde der Vβ-Gebrauch drei verschiedener Zellpopulationen in einer semiquantitativen PCR miteinander verglichen.

- 1) RT1f-alloreaktive V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellblasten
- 2) RT1f-alloreaktive V $\alpha$ 8.2- LEW CD8 T-Zellblasten
- 3) V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen

Die Populationen 1) und 2) sind polyklonale RT1f-alloreaktive Blasten; LEW LK-Zellen wurden mit Nylonwolle filtriert, immunmagnetisch depletiert (mAk W3/25 und Ox35) und in einer MLR mit RT1A<sup>f</sup> allogenen stimuliert (s. Kap. 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.7).

Die Population 3) wurde ebenfalls mit Nylonwolle filtriert und immunmagnetisch depletiert, jedoch nicht allogenen stimuliert, sondern 60 min bei 4°C in einer mit mAk G177 beschichteten Kulturflasche inkubiert („Panning“). Gebundene Zellen expandierten dann drei Tage in RPMI-Medium (Dutch modified; + 1/5 Vol Überstand von Concanavalin A-stimulierter Rattenmilzzellen; 20 U/ml IL-2), nach der Inkubation waren 95% der T-Zellen mAk G177+. Population 3) wurde freundlicherweise von Frau Dr. Torres-Nagel zur Verfügung gestellt.

Die cDNA der Populationen 1) – 3) wurde mittels kompetitiver PCR mit einem  $\beta$ -Aktin-KF und  $\beta$ -Aktin-Primern auf gleiche Konzentrationen eingestellt (Abb. 19; s. Kap. 3.2.19).

Eine semiquantitative PCR mit einem C $\beta$ -spezifischen (antisense-Primer) und 21 V $\beta$ -spezifischen (sense-Primer), alle bekannten V $\beta$ -Segmente der Ratte erkennenden Primern wurde durchgeführt, wobei Aliquots der PCR-Produkte nach 30, 35, 40 und 45 PCR-Zyklen gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Es wurde keine deutliche Überrepräsentation bestimmter V $\beta$ -Segmente in den untersuchten Zellpopulationen gefunden. V $\beta$ 9 und V $\beta$ 7 wurden etwas häufiger von V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen exprimiert (Abb. 20a und 20b), V $\beta$ 1 von den RT1f-alloreaktiven CD8 LEW T-Zellen etwas häufiger als von LEW.1F T-Zellen (Abb. 20c). Die 18 weiteren V $\beta$ -spezifischen Primer wiesen keine Unterschiede in der Expression von V $\beta$ -Segmenten zwischen den Zellpopulationen nach (Abb. 20d; exemplarisch gezeigt für V $\beta$ 10).

Somit ist der Beitrag von V $\beta$ -Segmenten zu RT1f-spezifischen Alloreaktivität und positiver Selektion V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen höchstens gering, auch wenn sich gewisse modulierende Effekte nicht ausschließen lassen (s. Diskussion). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den durchflußzytometrischen V $\beta$ -Repertoireanalysen (s. Kap. 4.3.1; Torres-Nagel et al., 1994 und 1997).

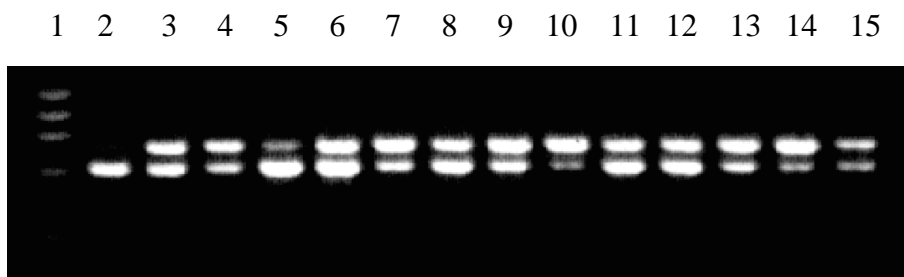


Abb. 19: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten einer kompetitiven PCR ( $\beta$ -Aktin-KF,  $\beta$ -Aktin-Primer).

Spur 1:  $\phi$ -Längenmarker.

Spuren 2 - 4: cDNA V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen; KF: 100 pg/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l

Spuren 5 - 7: cDNA V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen; KF: 100 pg/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l

Spuren 8 - 10: cDNA V $\alpha$ 8.2- LEW CD8 T-Zellen; KF: 100 pg/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l

Spuren 11 - 14: cDNA V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen; KF: 2 x 100 pg/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 1 pg/ $\mu$ l

Spur 15: Positivkontrolle.

obere Bande: Amplifikat der cDNA von CD8 T-Zellen.

untere Bande: amplifiziertes  $\beta$ -Aktin-KF.

KF: Kontrollfragment

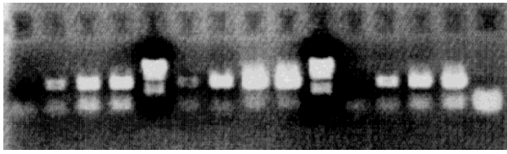


Abb. 20a

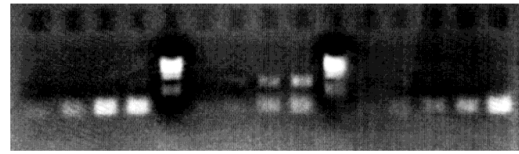


Abb. 20b

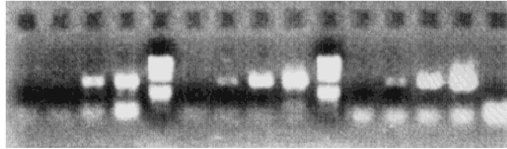


Abb. 20c

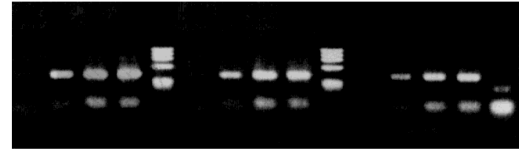


Abb. 20d

Abb. 20: TCR V $\beta$ -Gebrauchs RT1f-spezifisch positiv selektionierter (Spuren 1 - 4) und RT1f-alloreaktiver (Spuren 6 - 14) CD8 T-Zellen (semiquantitative PCR mit 1 C $\beta$ - und 21 V $\beta$ -spezifischen Primern).

Abb. 20a: V $\beta$ 9-Gebrauch; Abb. 20b: V $\beta$ 7-Gebrauch; Abb. 20c: V $\beta$ 1-Gebrauch; Abb. 20d: V $\beta$ 10-Gebrauch.

Spuren 5, 10:  $\phi$ -Längenmarker.

Spuren 1 - 4: cDNA V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen; 30, 35, 40, 45 PCR-Zyklen

Spuren 6 - 9: cDNA V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen; 30, 35, 40, 45 PCR-Zyklen

Spuren 11 - 14: cDNA V $\alpha$ 8.2- LEW CD8 T-Zellen; 30, 35, 40, 45 PCR-Zyklen

Spur 15: Positivkontrolle.

## 5 DISKUSSION

Der Kontakt eines TCR-Segments, nämlich der V $\alpha$ 8-Kette, mit einem bestimmten MHC-Klasse-I-Molekül (RT1A<sup>f</sup>) kann sowohl Alloreaktivität von V $\alpha$ 8+ CD8+ peripheren LEW T-Zellen (MHC-Haplotyp l) als auch positive Selektion von V $\alpha$ 8+ Thymozyten der LEW.1F Ratte (MHC-Haplotyp f) vermitteln (Torres-Nagel et al., 1994). Die Reaktion auf allogene MHC-Moleküle soll jedoch nach Modellvorstellungen zur TCR-vermittelten Antigenerkennung eine weitaus höhere Avidität (Gesamtbindungsstärke) zwischen T-Zelle und APC als die positive Selektion erfordern („differential-avidity model“: Ashton-Rickardt und Tonegawa, 1994).

In dieser Arbeit wurden variable Domänen der TCR  $\alpha$ -Ketten von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8+ LEW CD8 T-Zellen auf Nukleotid- und abgeleiteter Aminosäurenebene analysiert, um mit variablen Domänen der TCR  $\alpha$ -Ketten RT1f-spezifisch im Thymus positiv selektionierter („überselektionierter“) V $\alpha$ 8+ LEW.1F CD8 T-Zellen und nicht allogenen stimulierter V $\alpha$ 8+ LEW CD8 T-Zellen verglichen zu werden. Welche Unterschiede zwischen den TCR existieren, die unterschiedliche Aviditäten bewirken könnten? Werden unterschiedliche V $\alpha$ 8-Familienmitgliedern benutzt? Wird die basale Affinität des V $\alpha$ 8-Segments durch strukturelle Besonderheiten (Länge, Motive, Flexibilität, N-Nukleotidinsertionen) weiterer TCR-Komponenten (J $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ ) modifiziert? Besteht eine Abhängigkeit von der Paarung des V $\alpha$ 8-Segments mit bestimmten V $\beta$ -Ketten?

V $\alpha$ 8+ (mAk G177+) LEW.1F CD8 T-Zellen werden während der Reifung im Thymus zehnfach überselektioniert. 14,0% der reifen LEW.1F CD8 T-Zellen sind mAk G177+, bei RT1f-negativen Stämmen (MHC-Haplotypen: l, a, c, d, k, n und u) dahingegen nur 0,8% - 2,4% der CD8 T-Zellen. Während das Verhältnis von mAk G177+ CD8 T-Zellen zu mAk G177+ CD4 T-Zellen bei den sieben RT1f-negativen Stämmen nur zwei bis drei beträgt, beträgt es bei der LEW.1F Ratte 10 (Torres-Nagel et al., 1994). Parallel dazu führt die Stimulation von CD8 T-Zellen RT1f-negativer Rattenstämme (LEW und LEW.1A) mit LEW.1F DC (RT1A<sup>f</sup>+), jedoch nicht mit LEW.1A DC (RT1A<sup>a</sup>+), zu einer ca. dreifachen Zunahme von mAk G177+ Zellen von 2,0% auf 6,4% innerhalb der polyklonalen Population von allostimulierten Blasten (Torres-Nagel et al., 1994).

Zunächst wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen RT1A<sup>f</sup> und TCR V $\alpha$ 8-Segment während Alloreaktion und positiver Selektion im Thymus von unterschiedlichen Mitgliedern der V $\alpha$ 8-Familie vermittelt wird. Dazu wurden 200 unabhängige, d. h. von verschiedenen cDNA-Klonen stammende, in-frame Sequenzen drei verschiedener mAk G177+ Lymphozytenpopulationen analysiert (s. Kap. 4.2.3):

- (1) RT1f-alloreaktive mAk G177+ LEW CD8 T-Zellblasten, 100 Sequenzen
- (2) mAk G177+ LEW CD8 T-Zellen (nicht allogenen stimuliert), 50 Sequenzen (\*)
- (3) mAk G177+ LEW.1F CD8 T-Zellen, 50 Sequenzen (\*)

CDNA-Klone der gekennzeichneten (\*) Zellpopulationen wurden von Frau Dr. Torres-Nagel, Würzburg, sequenziert. Population (2) wurde in einer mit mAk G177 beschichteten Kulturflasche inkubiert („Panning“), die Zellen expandierten dann in RPMI-Medium + IL-2 (Torres-Nagel et al., 1994 und 1997).

1995 waren sieben Mitglieder der V $\alpha$ 8-Genfamilie der Ratte bekannt (Bezeichnungen: N61.5, 8.2 - 8.7), die zu 86,0% bis 99,1% auf DNA-Ebene und zu 75,3% bis 97,4% auf Aminosäureebene identisch waren (Giegerich et al., 1995). Vierzehn funktionelle V $\alpha$ 8-Segmente der Lewis Ratte waren 2001 bekannt, VA8S2 bis VA8S15 (Torres-Nagel et al., 2001), ebenso viele wie bei der Maus (Arden et al., 1995).

200 unabhängige TCR $\alpha$ -Transkripte aus mAk G177+ T-Zellen (1) - (3), die in einer PCR mit einem sense-Primer, der für alle bekannten V $\alpha$ 8-Familienmitglieder spezifisch ist, und einem C $\alpha$ -spezifischen antisense-Primer amplifiziert wurden, benutzten neben V $\alpha$ 8.2 kein weiteres V $\alpha$ 8-Familienmitglied. Der mAk G177 ist damit für nur ein Mitglied der V $\alpha$ 8-Familie spezifisch, nämlich für V $\alpha$ 8.2. Daneben wurde viermal in 100 Sequenzen der Population (1) V $\alpha$ 4 sequenziert, so daß der mAk G177 auch V $\alpha$ 4 erkennen könnte; alternativ könnte V $\alpha$ 4 von V $\alpha$ 8+ T-Zellen koexprimiert worden sein (s. Kap. 1.1). Die mit Hilfe des mAk G177 beobachtete RT1f-spezifische positive Selektion im Thymus und die RT1f-spezifische Alloreaktion wurden somit stets durch dasselbe V $\alpha$ 8-Familienmitglied vermittelt, nämlich V $\alpha$ 8.2.



Existieren V $\beta$ -Segmente, die durch bevorzugte Paarung mit dem TCR V $\alpha$ 8.2-Segment einen Beitrag zu Alloreaktivität und positiver Selektion leisten? Vier V $\beta$ -spezifische Antikörper, die zusammen ca. 25% des V $\beta$ -Repertoires der Ratte erkennen (V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.5, V $\beta$ 10, V $\beta$ 16), wiesen keine deutlichen Unterschiede (> Faktor 1,7) im Gebrauch von TCR  $\beta$ -Ketten bei V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen nach (s. Kap. 4.3.1). Durchflußzytometrisch analysiert wurden RT1f-alloreaktive LEW CD8 T-Zellen insgesamt und die V $\alpha$ 8.2+ (mAk G177+) sowie V $\alpha$ 8.2- (mAk G177-) Teilpopulationen der RT1f-alloreaktiven LEW CD8 T-Zellen. V $\beta$ 8.2 wurde von V $\alpha$ 8.2+ RT1f-alloreaktiven LEW Blasten etwas häufiger exprimiert als von RT1f-alloreaktiven CD8 LEW T-Zellen insgesamt (Faktor 1,6) und als von V $\alpha$ 8.2- T-Zellblasten (Faktor 1,7). V $\beta$ 16 wurde von V $\alpha$ 8.2- T-Zellblasten und den RT1f-alloreaktiven T-Zellen insgesamt etwas häufiger exprimiert als von V $\alpha$ 8.2+ T-Zellblasten (Faktor 1,7 bzw. 1,6). Größere Differenzen wurden nicht beobachtet. V $\beta$ 8.5 und V $\beta$ 10 waren in den Populationen gleichermaßen vertreten (s. Kap. 4.3.1, Tab. 4).

Das V $\beta$ -Repertoire der RT1f-spezifisch überselektionierten LEW.1F CD8 T-Zellen (3) wurde mit drei V $\beta$ -spezifischen mAk, die zusammen ca. 20% des V $\beta$ -Repertoires erfaßten (V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.5, V $\beta$ 16), durchflußzytometrisch analysiert (Torres-Nagel et al., 1997). Eine geringe Überrepräsentation (Faktor 1,4) des V $\beta$ 8.2-Segments wurde bei V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F T-Zellen im Vergleich zu LEW.1F CD8 T-Zellen insgesamt nachgewiesen. Eine Bevorzugung von V $\beta$ 8.2 wurde jedoch ebenso bei V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen im Vergleich zu LEW CD8 T-Zellen insgesamt nachgewiesen. Somit ist diese Überrepräsentation wahrscheinlich Ausdruck einer bevorzugten V $\alpha$ /V $\beta$ -Paarung und kein Hinweis auf einen Beitrag von V $\beta$ 8.2 zur RT1f-spezifischen positiven Selektion oder Alloreaktivität von V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen (Torres-Nagel et al., 1997). RT1f-alloreaktive V $\alpha$ 8.2+ LEW T-Zellen verwendeten das V $\beta$ 8.5-Segment 2,6mal häufiger als RT1f-überselektionierte V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen (12,38% vs. 4,7%), ein Hinweis auf einen Beitrag von V $\beta$ 8.5 zur RT1f-spezifischen Alloreaktivität. Dieser Beitrag reicht zwar nicht aus, um das Vorkommen V $\alpha$ 8.2+/V $\beta$ 8.5+ LEW.1F T-Zellen zu verhindern, könnte aber verantwortlich sein für die Unterrepräsentation von V $\alpha$ 8.2+/V $\beta$ 8.5+ LEW.1F CD8 T-Zellen (4,7%) im Vergleich zu V $\beta$ 8.5+ LEW.1F CD8 T-Zellen insgesamt (7%).

Eine semiquantitative PCR mit 21 V $\beta$ -spezifischen Primern, die das gesamte bekannte V $\beta$ -Repertoire der Ratte erfaßten, bestätigte die Hypothese eines nahezu nicht selektiven V $\beta$ -Gebrauch von RT1f-spezifisch selektionierten bzw. RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen (s. Kap. 4.3.2). Analysiert wurde cDNA von drei Zellpopulationen:

- RT1f-alloreaktive V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellblasten
- RT1f-alloreaktive V $\alpha$ 8.2- LEW CD8 T-Zellblasten
- V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen

V $\beta$ 9 und V $\beta$ 7 wurden von V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen etwas häufiger exprimiert als von V $\alpha$ 8.2- LEW oder LEW.1F T-Zellen, V $\beta$ 1 etwas häufiger sowohl von V $\alpha$ 8.2+ LEW als auch von V $\alpha$ 8.2- LEW CD8 Blasten, ohne daß das Verfahren der semiquantitativen PCR eine genaue Quantifizierung ermöglichte. Mit den anderen 18 V $\beta$ -spezifischen Primern wurden keine Unterschiede in der Expression von V $\beta$ -Segmenten zwischen den drei Zellpopulationen nachgewiesen. Die semiquantitative PCR bestätigte die durchflußzytometrisch gefundenen Differenzen in der Verwendung von TCR V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 8.5 und V $\beta$ 16 nicht. Dies weist auf eine geringere Sensitivität der semiquantitativen PCR im Vergleich zur Durchflußzytometrie hin.

Die Interaktion von TCR V $\beta$  mit MHC-Molekülen differiert in Röntgenstrukturanalysen verschiedener TCR/MHC-Komplexe, während die Kontakte, die CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  mit dem MHC-Molekül ausbilden, konstant bleiben. Garcia et al. beschrieben 1996 und 1998 eine Interaktion von CDR1 $\beta$  und CDR2 $\beta$  des 2C TCR mit H-2K<sup>b</sup>, ebenso fanden Teng et al. 1998, daß CDR2 $\beta$  (N15 TCR) mit H-2K<sup>b</sup> interagiert. Dagegen stellten Garboczi et al. 1996 keine Interaktion von V $\beta$  (A6 TCR) mit HLA-A2 fest. Das TCR V $\alpha$ -Segment scheint die (bei MHC-Klasse-I-Molekülen diagonale) Orientierung des TCR zum pMHC vorzugeben und könnte damit die Interaktion des Korezeptors (CD4 oder CD8) mit dem MHC-Molekül beeinflussen (s. Kap. 1.5, 1.6).

Die allelspezifische Interaktion von nur einem (V $\alpha$ 8.2) von derzeit 63 bekannten funktionellen TCR V $\alpha$ -Segmenten mit polymorphen RT1A<sup>f</sup>-Determinanten selektioniert 14% der peripheren LEW.1F T-Zellen und vermittelt Alloreaktivität, ohne daß ein wichtiger Beitrag von TCR-V $\beta$ -Segmenten nachgewiesen werden konnte. Auch wenn ein gewisser modulierender Beitrag der V $\beta$ -Domäne nicht ausgeschlossen werden

konnte, scheinen somit für RT1f-spezifische Überselektion und Alloreaktivität in unserem Modell hauptsächlich pMHC/V $\alpha$ -Kontakte entscheidend zu sein.

Neben dem Gebrauch von V $\beta$ -Segmenten wurde die differenzielle Expression der TCR J $\alpha$ -Gene der Zellpopulationen (1) - (3) (s. o.) untersucht. Dazu wurden jeweils 50 unabhängige TCR $\alpha$ -Transkripte der T-Zellpopulationen (1) - (3) und einer vierten Population unreifer V $\alpha$ 8.2+ LEW DP Thymozyten (4) verglichen (Abb. 21). Die Zellpopulation (4) (\*) wurde *in vitro* aus ihren unmittelbaren Vorläuferzellen generiert, also nicht *in vivo* selektioniert (Übernachtkultur von CD4- CD8+ LEW Thymozyten: Paterson und Williams, 1987; Hünig und Mitnacht, 1991).

46 TCR J $\alpha$ -Segmente der Ratte waren 1998 bekannt (Torres-Nagel et al., 1996 und 1998). Während der Analyse von 120 TCR $\alpha$ -Ketten von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (1) wurden 10 weitere TCR J $\alpha$ -Ketten auf cDNA-Ebene identifiziert (s. Kap. 4.2.5). Die genomische Lokalisation der J $\alpha$ -Gene kann durch Vergleich mit homologen Maus J $\alpha$ -Genen vorausgesagt werden (Koop et al., 1994). Maus J1 liegt am weitesten 3' und Maus J58 am weitesten 5' im J $\alpha$ -Locus.

In den ersten 50 unabhängigen TCR $\alpha$ -Transkripten aus RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW Blasten (1) wurden nur 19 verschiedene J $\alpha$ -Gene gefunden (s. Kap. 4.2.6). Fast die Hälfte (46%) der cDNA-Klone benutzte eines von drei J $\alpha$ -Genen, und 64% der Klone eines von sechs verschiedenen J $\alpha$ -Genen. RVA21 (Maus J47) fand sich in 10, RTJA1 (Maus J7) in acht und RVA25 (Maus J26) in fünf cDNA-Klonen (Abb. 21D). Unter der Annahme, daß 50 J $\alpha$ -Sequenzen zur Verfügung stehen und Normalverteilung besteht, sind die J $\alpha$ -Segmente von 18 der 50 unabhängigen cDNA-Klone mit einer Wahrscheinlichkeit  $p \geq 99,69\%$  nicht zufällig gewählt. Der J $\alpha$ -Gebrauch korrelierte nicht mit der genomischen Position der TCR J $\alpha$ -Gene: während J47 im 5' Bereich des J $\alpha$ -Genlocus liegt, liegt J26 zentral und J7 am 3' Ende des Genlocus. Die Zahlen spiegeln keine klonale Expansion besonders responsiver Klone wider, da nur unabhängige cDNA-Klone (TCR $\alpha$ -Sequenzen unterschieden sich bei identischem J $\alpha$  im CDR3 $\alpha$ -Bereich) berücksichtigt wurden. Für die V $\alpha$ 8.2-vermittelte RT1f-spezifische Alloreaktion wird also ein beschränktes J $\alpha$ -Repertoire verwendet.

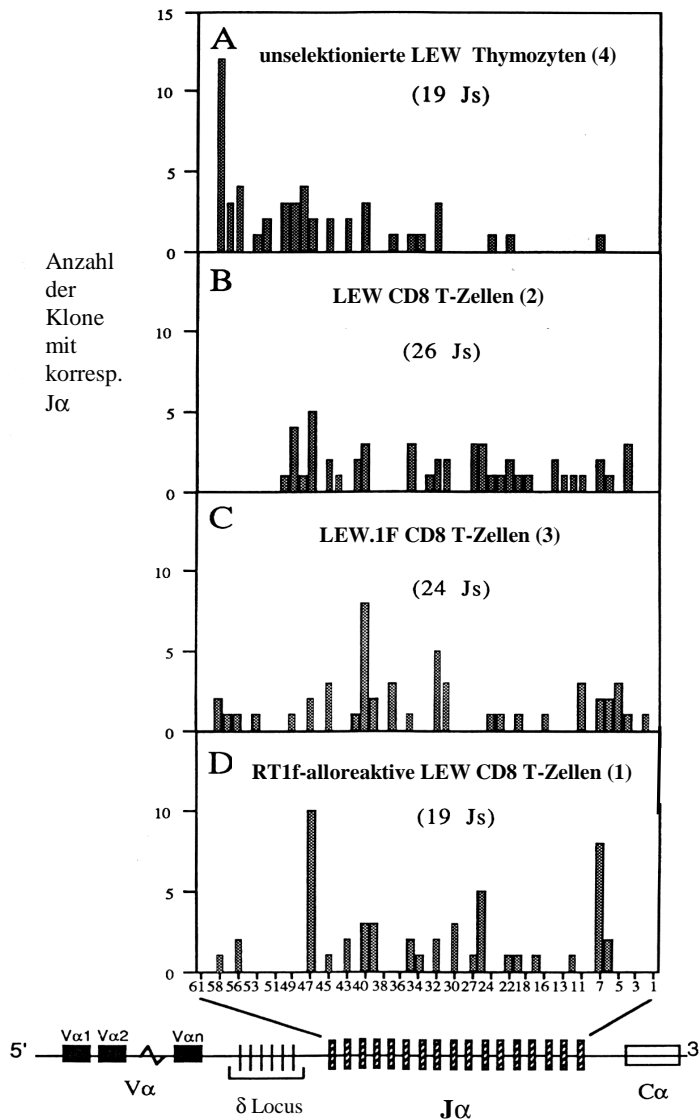


Abb. 21:  
J $\alpha$ -Gebrauch in unselektionierten und RT1f-selektionierten V $\alpha$ 8.2+ TCR $\alpha$ -Ketten.  
Balken: Anzahl der cDNA-Klone mit korrespondierendem J $\alpha$ -Segment.  
Abszisse: J $\alpha$ -Segmente, geordnet nach genomischer Lokalisation (Vergleich mit Maus J $\alpha$ -Sequenzen; Koop et al., 1994).  
Gezeigt sind jeweils 50 unabhängige in-frame Sequenzen von cDNA-Klonen der Populationen (1) – (4) (Torres-Nagel et al., 1997).

In 50 unabhängigen cDNA-Klonen der im Thymus überselektionierten V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T Zellen (3) wurden 24 verschiedene J $\alpha$ -Gene gefunden. In einer Minderheit der TCR  $\alpha$ -Ketten wurden Zeichen eines selektiven J $\alpha$ -Gebrauchs gefunden (Abb. 21C). Das J $\alpha$ -Segment RVA56 (Maus J40) wurde 8x, das Segment RTJA10 (Maus J32) wurde 5x verwendet, was mit einer Wahrscheinlichkeit  $p \geq 99,69\%$  (RVA56) bzw.  $p \geq 85\%$  (RTJA10) einen selektiven J $\alpha$ -Gebrauch widerspiegelt. Die drei von RT1f-allergischen V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (1) am häufigsten benutzten J $\alpha$ -Segmente wurden nur in vier Klonen von RT1f-spezifisch überselektionierten T-Zellen (3) gefunden, was auf den wichtigen Beitrag dieser drei J $\alpha$ -Segmente zur Erhöhung der Avidität von V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen und RT1A<sup>f</sup>+ Zellen hinweist. Es bestand keine Korrelation von J $\alpha$ -Gebrauch und

genomischer Lokalisation der J $\alpha$ -Gene. Somit benutzten 26% der analysierten Sequenzen mit  $p \geq 85\%$  RT1f-spezifisch überselektionierte J $\alpha$ -Segmente (Torres-Nagel et al., 1997). Einige J $\alpha$ -Segmente scheinen die Wahrscheinlichkeit, mit der ein V $\alpha$ 8.2+ Thymozyt RT1f-spezifisch ins CD8-Kompartiment selektioniert wird, zu erhöhen, ohne daß die Überselektion von V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen mit einem so streng restringierten J $\alpha$ -Kettengebrauch einherginge, wie er für die RT1f-spezifische Alloreaktion V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen gefunden wurde.

Bei unselektionierten V $\alpha$ 8.2+ LEW DP Thymozyten (4) bestand hingegen eine deutliche Korrelation zwischen J $\alpha$ -Gebrauch und vermuteter genomischer Lokalisation des J $\alpha$ -Segments (Torres-Nagel et al., 1997). Bei diesen aus einer Übernachtkultur von CD4-CD8+ LEW Thymozyten stammenden DP Thymozyten hat nur das primäre Rearrangement des TCR $\alpha$  Locus stattgefunden. J $\alpha$ -Gensegmente der 5' Hälfte des J $\alpha$ -Genlocus werden beim primären Rearrangement des TCR $\alpha$ -Locus viel häufiger verwendet als die der 3' Hälfte (Petrie et al., 1995; s. Kap. 1.2). In 44 cDNA Klonen wurden J $\alpha$ -Gene gefunden, die „upstream“ (5' Bereich) von Maus J33 liegen und nur in sechs cDNA-Klonen Gene, die „downstream“ (3' Bereich) von Maus J33 lokalisiert sind (Abb. 21A). Das am häufigsten gefundene J $\alpha$ -Gen, das 12 von 50 cDNA-Klone benutzten, entsprach Maus J58, dem am weitesten 5' lokalisierten Gen aller identifizierten Maus J $\alpha$ -Gene. Die prolongierte Inkubation von DP Thymozyten führt bei der Maus als Folge des sekundären Rearrangements zu einem Verlust der Überrepräsentation der im 5' Bereich lokalisierten J $\alpha$ -Segmente. In der Zeitspanne zwischen dem Eintritt in das Kompartiment der DP Thymozyten und positiver Selektion findet eine Randomisierung des J $\alpha$ -Gebrauchs statt (Petrie et al., 1995).

In 50 unabhängigen cDNA-Klonen von unstimulierten V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen des nicht-überselektionierenden LEW Stamms (2) wurden 26 verschiedene J $\alpha$ -Gene gefunden (Torres-Nagel et al., 1997). Das am häufigsten benutzte J $\alpha$ -Gen, RVA21 (Maus J47), wurde 5x gefunden (Abb. 21B). Damit waren nur fünf von 50 J $\alpha$ -Segmenten mit  $p \geq 85\%$  RT1f-spezifisch überselektioniert. Eine Korrelation von J $\alpha$ -Gebrauch und genomischer Lokalisation der J $\alpha$ -Segmente wurde nicht gefunden. Ein selektiver Gebrauch von J $\alpha$ -Segmenten des nicht antigenspezifisch expandierten oder

allelspezifisch überselektionierten TCR-Repertoires besteht somit nur in sehr geringem Ausmaß.

Welche Besonderheiten besitzen die CDR3 $\alpha$ -Schleifen der RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (1) im Vergleich mit CDR3 $\alpha$ -Regionen unstimulierter V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (2)? Um strukturelle Eigenschaften zu identifizieren, die die Avidität von V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen und RT1A<sup>f</sup>+ Zellen verstärken, wurden die CDR3 $\alpha$ -Schleifen der LEW-anti-LEW.1F alloreaktiven T-Zellen (1) analysiert, die eines der drei am häufigsten gefundenen J $\alpha$ -Segmente exprimierten (23 von 50 cDNA Klonen; s. Kap. 4.2.6). In 20 der 23 CDR3 $\alpha$ -Ketten wurde folgendes AS-Motiv („Allomotiv“) gefunden: (hydrophob)-hydrophob-G/N-N/Q-K/G-I/L (G: Glycin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, N: Asparagin, Q: Glutamin). Ein Glycin- oder Asparaginrest liegt im Zentrum der CDR3 $\alpha$ -Schleife zwischen einer oder zwei ungeladenen (Valin, Phenylalanin, Tyrosin) AS, von denen eine aromatisch (Phenylalanin oder Tyrosin) ist, am V-proximalen Ende und einer amphiphilen AS (Asparagin oder Glutamin: AS mit ungeladenen, polaren Amidgruppen) am C-proximalen Ende. Dieses hydrophob/amphiphile Motiv wurde nicht in den CDR3 $\alpha$ -Regionen der V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (2) gefunden, die J $\alpha$ -Segmente benutzten, die in der RT1f-alloreaktiven Population (1) nicht vertreten waren (Torres-Nagel et al., 1997). Das Motiv war somit wahrscheinlich auf RT1f-alloreaktive T-Zellen (1) beschränkt.

Die Existenz des „Allomotivs“ deutet darauf hin, daß neben den TCR V $\alpha$ -vermittelten (CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ ) Kontakten zum MHC-Klasse-I-Molekül zusätzliche Kontakte für eine Alloreaktion erforderlich sind. Worin könnte die Funktion des Motivs bestehen? Asparagin und in noch größerem Maß Glycin können einer Polypeptidkette Flexibilität verleihen und somit durch benachbarte Aminosäuren verursachte strukturelle Einschränkungen ausgleichen (Chothia et al., 1988). Die aromatischen und amphiphilen AS des Motivs sind promisk. Promiske und flexible CDR3 $\alpha$ -Regionen bewirken, daß der TCR Bindungen mit einem erweiterten Spektrum von Peptidliganden mit größerer Avidität (TCR/pMHC) eingehen kann. Alternativ könnte der Asparaginrest nicht dem Liganden gegenüber exponiert, sondern in der CDR3 $\alpha$ -Schleife verborgen liegen und durch Wasserstoffbrückenbindungen die Stabilität der TCR-Struktur erhöhen. Dadurch könnten aromatische Seitenketten exponierter werden und so Bindungen zum MHC-Molekül verstärken. Aromatische Seitenketten besitzen große Oberflächen, an denen sich

Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte ausbilden können und die so die Ligandenbindung verstärken (Padlan, 1990). Zusätzliche direkte Kontakte der CDR3 $\alpha$ -Schleife zum MHC-Molekül könnten ferner vermittelt werden. Das „Allomotiv“ gestattet wahrscheinlich Interaktionen des V $\alpha$ 8.2+ TCR mit MHC-Molekülen, die einen hochdiversen Peptidsatz präsentieren, und bewirkt so vor allem durch Erhöhung der Anzahl möglicher Liganden eine für Alloreaktionen erforderliche Zunahme der Avidität zwischen T-Zelle und APC (Ashton-Rickardt et al., 1994; Hogquist et al., 1994; Alam et al., 1996).

Die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilungen der Zellpopulationen (1) – (4) veranschaulicht Abb. 23. 58% der CDR3 $\alpha$ -Ketten von LEW-anti-LEW.1F V $\alpha$ 8.2+ alloreaktiven T-Zellen (1) bestanden aus sieben AS. Der Mittelwert der CDR3 $\alpha$ -Längen betrug 7,06 AS mit einer Standardabweichung  $s = 0,89$  (50 unabhängige Sequenzen; Definition des CDR3 $\alpha$  nach Fields et al., 1995; s. Kap. 4.2.10). Achtzehn der 23 CDR3 $\alpha$ -Schleifen LEW-anti-LEW.1F alloreaktiver T-Zellen, die eines der drei am häufigsten gefundenen J $\alpha$ -Segmente benutzten, bestanden aus sieben AS, nur zwei CDR3 $\alpha$ -Ketten waren (um eine AS) länger. Dagegen betrug der Mittelwert der CDR3 $\alpha$ -Längen bei unstimulierten V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (2) 7,56 AS, und die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilung war heterogener (50 unabhängige Sequenzen; Torres-Nagel et al., 1997). CDR3 $\alpha$ -Ketten der unstimulierten V $\alpha$ 8.2+ LEW T-Zellen, die J $\alpha$ -Segmente benutzten, die in RT1f-alloreaktiven LEW T-Zellen nicht vertreten waren, waren zu über 50% länger als sieben AS (Mittelwert: 7,62). RT1f-alloreaktive LEW Blasten bevorzugten also kurze CDR3 $\alpha$ -Schleifen, und die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilung war homogen. Die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilungen der unstimulierten (2) und der RT1f-alloreaktiven (1) LEW T-Zellblasten unterschieden sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$  (Torres-Nagel et al., 1997). (Zur CDR3 $\alpha$ -Längenverteilung der Populationen (3) und (4) s. S. 107.)

N-Nukleotidinsertionen beeinflussen die CDR3 $\alpha$ -Länge (s. Kap. 1.2). Die Anzahl der N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Regionen der Zellpopulationen (1) – (4) wird in Abb. 22 verglichen. Analysiert wurden jeweils 50 unabhängige in-frame Sequenzen (s. Kap. 4.2.9). 34% der TCR $\alpha$  Ketten von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW CD8 T-Zellen (1) besaßen keine N-Nukleotidinsertionen, dahingegen nur 17% der unstimulierten V $\alpha$ 8.2+

LEW T-Zellen (2). Das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) wird für die Insertion von N-Nukleotiden benötigt (Komori et al., 1993). TCR von CD8 T-Zellen TdT-defizienter Mäuse weisen eine erhöhte Peptid-Promiskuität auf im Vergleich zu TCR nicht-TdT-defizienter Mäuse (Gavin und Bevan, 1995). Dies weist darauf hin, daß kurze CDR3 $\alpha$ -Schleifen ohne N-Nukleotidinsertionen ebenfalls eine Zunahme der TCR-Promiskuität bewirken, also mit MHC-Molekülen, die einen sehr vielgestaltigen Peptidsatz präsentieren, interagieren und daß so die Avidität durch Zunahme der Ligandendichte gesteigert wird.

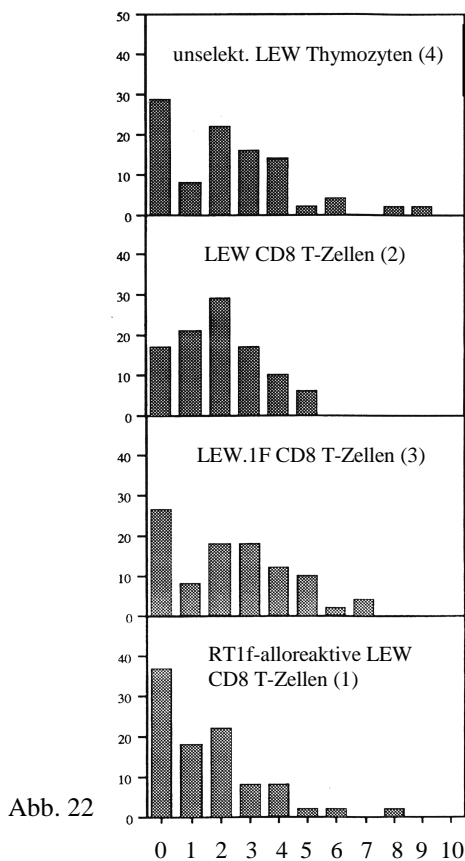


Abb. 22

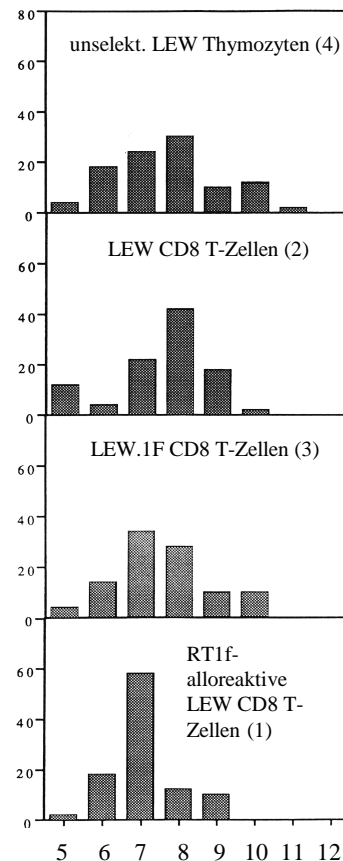


Abb. 23

Abb. 22: N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Region. Abszisse: Anzahl der N-Nukleotide der CDR3 $\alpha$ -Region. Balken: Frequenz (%) von cDNA-Klonen mit korrespondierender Anzahl von N-Nukleotiden. Gezeigt sind jeweils 50 unabhängige in-frame Sequenzen (Torres-Nagel et al., 1997).

Abb. 23: CDR3 $\alpha$ -Längenverteilung. Abszisse: CDR3 $\alpha$ -Länge (Anzahl der AS). Balken: Frequenz (%) der cDNA-Klone mit korrespondierender CDR3 $\alpha$ -Länge. Gezeigt sind jeweils 50 unabhängige in-frame Sequenzen (Torres-Nagel et al., 1997). (Definition des CDR3 $\alpha$ : Fields et al., 1995.)



Somit selektioniert die Allostimulation von  $V\alpha 8.2+$  LEW CD8 T-Zellen kurze, promiske und flexible CDR3 $\alpha$ -Schleifen mit geringen N-Nukleotidadditionen und einem hydrophob/amphiphilen Motiv, das durch bevorzugten J $\alpha$ -Gebrauch erzeugt wird.

Die beiden überselektionierten J $\alpha$  Segmente RVA56 und RTJA10, die in 13 von 50 cDNA-Klonen von  $V\alpha 8.2+$  LEW.1F CD8 T-Zellen (3) gefunden wurden, besaßen ein ähnliches Motiv der CDR3 $\alpha$ -Schleife wie RT1f-alloreaktive T-Zellen (1). In dem „LEW.1F“-Motiv S/T-G-N-K-L/Y (G: Glycin, K: Lysin, L: Leucin, N: Asparagin, S: Serin, T: Threonin, Y: Tyrosin), das in 11 der 13 CDR3 $\alpha$ -Ketten vorlag, werden eine schwach polare (Serin oder Threonin: polare Hydroxylgruppe) und eine ungeladene (Leucin: ungeladen, unpolar; Tyrosin: ungeladen, polare Hydroxylgruppe) AS durch einen zentralen Glycinrest und einen Asparaginrest getrennt, der der CDR3 $\alpha$ -Schleife eine erhöhte Flexibilität verleiht. Dieses Motiv könnte ebenso wie das „Allomotiv“ aufgrund der Zunahme der Flexibilität die Peptidpromiskuität des TCR erhöhen oder die Interaktion mit dem MHC-Molekül selbst verstärken. So könnte die RT1A<sup>f</sup>-Rekognition während der positiven Selektion insbesondere durch Erhöhung der Anzahl potentieller Liganden und daneben durch Verbesserung des Kontakts TCR/pMHC unterstützt werden. Das „LEW.1F“-Motiv wurde in 22% der CDR3 $\alpha$ -Schleifen (3) gefunden, während das hydrophob/amphiphile Allomotiv in 40% der CDR3 $\alpha$ -Schleifen (1) vorlag.

Neben diesem Motiv wurden keine Restriktionen im CDR3 $\alpha$ -Bereich durch RT1f-spezifische positive Selektion nachgewiesen (Torres-Nagel et al., 1997). Der Mittelwert der Längen von 50 unabhängigen CDR3 $\alpha$ -Sequenzen der überselektionierten LEW.1F T-Zellen (3) betrug 7,7 AS (Abb. 23). CDR3 $\alpha$ -Schleifen der TCR, die ein bevorzugtes J $\alpha$ -Segment gebrauchten (n = 13), unterschieden sich nicht signifikant von CDR3 $\alpha$ -Schleifen der  $V\alpha 8.2+$  LEW.1F CD8 T-Zellen insgesamt (n = 50) hinsichtlich durchschnittlicher Länge und Heterogenität der Längen. Die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilung der LEW.1F T-Zellen (3) unterschied sich von der Längenverteilung der RT1f-alloreaktiven T-Zellen (1) (p < 0,01) und zeigte keinen Hinweis für eine Selektion von CDR3 $\alpha$ -Schleifen einer bestimmten Länge.  $V\alpha 8.2+$  LEW DP Thymozyten (4) benutzten CDR3 $\alpha$ -Schleifen mit einer durchschnittlichen Länge von 7,68 AS. Die CDR3 $\alpha$ -Längenverteilungen der LEW.1F T-Zellen (3), der unstimulierten LEW CD8 T-Zellen (2) und der unselektionierten LEW DP Thymozyten (4) unterschieden sich nicht

signifikant. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung von Rock et al. (1994), daß die Längenverteilung der CDR3 $\alpha$ - und CDR3 $\beta$ -Schleifen durch die Selektion im Thymus nicht beeinflußt wird.

26% der LEW.1F T-Zellen (3) benutzten keine N-Nukleotide; 28% der DP Thymozyten (4) benutzten keine N-Nukleotide (Abb. 22). Somit wurden N-Nukleotidinsertionen im V $\alpha$ /J $\alpha$ -Übergangsbereich bei RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen seltener gefunden als bei den Populationen (2), (3) und (4).

RT1f-spezifische Überselektion ist somit mit einer großen Vielfalt des J $\alpha$ /CDR3 $\alpha$ -Bereichs vereinbar. Somit können in der Keimbahn kodierte TCR V $\alpha$ -Segmente Selbst-MHC-Restriktion bewirken, ohne die TCR-Repertoirediversität deutlich herabzusetzen, wahrscheinlich durch Erkennung konservierter und polymorpher (klassen- und allelspezifischer) Determinanten des MHC-Moleküls durch CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$ .

Die Restriktionen der CDR3 $\alpha$ /J $\alpha$ -Komposition sind bei RT1f-alloreaktiven LEW T-Zellen (1) weitaus prominenter als bei RT1f-spezifisch selektionierten LEW.1F T-Zellen (3), wo sie sich im wesentlichen auf ein in ca. 20% vorliegendes CDR3 $\alpha$ -Motiv beschränken. Dies spiegelt wahrscheinlich wider, daß für die Aktivierung peripherer T-Zellen im Vergleich zur Selektion im Thymus eine höhere Aviditätsschwelle erreicht werden muß (Ashton-Rickardt et al., 1994). Nur 8% der RT1f-spezifisch überselektionierten LEW.1F CD8 T-Zellen benutzten das „Allomotiv“, das 40% der RT1f-alloreaktiven LEW CD8 T-Zellen benutzten (Torres-Nagel et al., 1997). Dies weist darauf hin, daß dieses Motiv wesentlich zum Erreichen der Schwelle beiträgt, die für periphere T-Zellaktivierung besteht.

Neben dem Boostern der pMHC-Interaktionen durch erhöhte Peptidpromiskuität und somit erhöhte Ligandendichte könnten auch andere Ursachen für einen restringierten J $\alpha$ /CDR3 $\alpha$ -Gebrauch von alloreaktiven T-Zellen bestehen. Die Beschreibung eines mAk, der ein V $\alpha$ -Segment der Maus J $\alpha$ -abhängig erkennt, wurde als Hinweis auf eine Beeinflussung der Tertiärstruktur des V $\alpha$ -Segments und damit der Affinität von TCR V $\alpha$  zum MHC-Molekül durch TCR J $\alpha$  interpretiert (Jameson et al., 1991). Die Topologie der Interaktion zwischen einem humanen TCR und seinem Liganden weist darauf hin, daß die CDR3 $\alpha$ -Schleife nicht nur mit dem Peptid, sondern auch (wie CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$

und CDR3 $\beta$ ) direkt mit der  $\alpha$ 1-Helix des Klasse-I-MHC-Moleküls interagiert und so die V $\alpha$ -vermittelte Bindung verstärkt (Garboczi et al., 1996; s. Kap. 1.6).

Es wurde nicht ausgeschlossen, daß die CDR3 $\alpha$ -Schleifen der RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen spezifisch mit einem oder wenigen verwandten Peptiden interagieren. Eine hohe Peptidspezifität wurde bei anderen alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen beschrieben (z. B. Udaka et al., 1992). Die Anzahl von TCR-triggernden Ereignissen, die zur Aktivierung einer alloreaktiven T-Zelle erforderlich sind, kann zwei Komponenten besitzen, nämlich erstens eine evtl. CDR3 $\alpha$ -unabhängige Interaktion von TCR V $\alpha$ -Segment und MHC-Molekül mit hoher Ligandendichte und niedriger Affinität und zweitens die CDR3 $\alpha$ -vermittelte Interaktion mit dem Peptid mit hoher Affinität, aber niedriger Ligandendichte (Valitutti et al., 1995; Beeson et al., 1996). Periphere T-Zellen können auf beide Weisen getriggert werden (Schodin et al., 1996). Ferner zeigen Röntgenstrukturanalysen, daß CDR1 $\alpha$  auch mit dem N-terminalen Peptidbereich interagiert (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996; Ding et al., 1998; Teng et al., 1998; s. Kap. 1.6), so daß ein Beitrag eines RT1f-spezifischen Peptidmotivs zur Spezifität von V $\alpha$ 8.2+ TCR für RT1A<sup>f</sup> von uns nicht ausgeschlossen werden kann.

Die ungleiche Repräsentation von TCR V $\alpha$ -Segmenten im CD4- und CD8-Kompartiment wurde wiederholt beschrieben (z. B. V $\alpha$ 11, Maus: Jameson et al., 1990 und Sim et al., 1999; V $\alpha$ 12.1, Mensch: DerSimonian et al., 1991; V $\alpha$ 2, Maus: Pircher et al., 1992; s. Kap. 1.6). Ursache dafür könnte entweder eine bevorzugte Interaktion von Motiven der V $\alpha$ -Segmente mit MHC-klassenspezifischen Determinanten oder mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 während der positiven Selektion sein (Janeway und Bottomly, 1996). Das V $\alpha$ 3.1-Element der Maus wird bevorzugt im CD4-Kompartiment exprimiert, während das V $\alpha$ 3.2-Element im CD8-Kompartiment überrepräsentiert wird. Eine Punktmutation des V $\alpha$ 3.1-Gens im CDR1 $\alpha$ - oder CDR2 $\alpha$ -kodierenden Bereich genügt, um die Selektion vom CD4- ins CD8-Kompartiment zu verschieben (Sim et al., 1996). Diese Kontrolle der MHC-klassenspezifischen Selektion von V $\alpha$ 3-Familienmitgliedern durch CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  stützt das Konzept, daß die direkte Interaktion mit MHC-Molekül-Determinanten zu der ungleichen Verteilung von TCR V Segmenten führt.

Sämtliche  $V\alpha 11$ -Familienmitglieder sind ungleich im CD4- und CD8-Kompartiment repräsentiert. Zusätzlich zu MHC-klassenspezifischen wurden dabei MHC-allelspezifische Beiträge beobachtet. Segregationsanalysen zeigten eine Kopplung von CD4/CD8-Quotient und TCR $\alpha$ -Locus (Sim et al., 1998 und 1999). Auch für  $V\beta$ -Segmente wurde eine bevorzugte Expression im CD4- oder CD8-Kompartiment beschrieben (Tomonari, 1992; Herrmann et al., 1999; Stienekemeier et al., 2000).

Die große Anzahl von 63 funktionellen  $V\alpha$ -Segmenten der Ratte (Torres-Nagel et al., 1998), die Familien bilden mit Mitgliedern, die sich vor allem in den CDR1- und CDR2-Schleifen unterscheiden, welche die wichtigsten Kontakte zum MHC-Molekül vermitteln, weist auf eine Koevolution des TCR  $V\alpha$ -Locus mit dem hochpolymorphen MHC-Locus hin. Dabei wurden  $V\alpha$ -Segmente erzeugt, die sich in ihrer Affinität zu Determinanten unterscheiden, die allen MHC-Molekülen gemein sind, MHC-klassenspezifisch oder MHC-allelspezifisch sind. Wie die nur mäßige (zwei- bis dreifache) Überselektion von  $V\alpha 8.2+$  T-Zellen ins CD8-Kompartiment bei MHC-kongenem RT1f-negativen Ratten und die dramatische, zehnfache RT1f-spezifische Überselektion ins CD8-Kompartiment zeigen, kann ein TCR  $V\alpha$ -Segment durch Interaktion mit MHC-klassenspezifischen Epitopen eine Überselektion bewirken, die durch zusätzliche Interaktion mit MHC-allelspezifischen Determinanten deutlich gesteigert wird (Torres-Nagel et al., 1994). Die Expansion von  $V\alpha 8.2+$  CD8 T-Zellen nach RT1f-spezifischer Allostimulation belegt ferner, daß dasselbe  $V\alpha$ -Segment sowohl MHC-klassenspezifisch positive Selektion als auch MHC-allelspezifisch in der Peripherie Alloreaktivität vermitteln kann. Dies steht im Einklang mit Röntgenstrukturanalysen, die zeigen, daß  $V\alpha$ -kodierte CDR-Schleifen des Menschen sowohl konservierte (klassenspezifische) als auch polymorphe (allelspezifische) MHC-Klasse-I-Determinanten erkennen (Garboczi et al., 1996).

Quantitative Modelle postulieren, daß Affinität, Avidität oder Kinetik eines TCR entscheiden, ob positiv oder negativ (oder nicht) selektioniert wird, während in qualitativen Modellen Änderungen der TCR-Konformation Modulierungen der Signaltransduktion bewirken (Janeway, 1995; Germain et al., 1997). Konformationsänderungen der komplexen, an der Signaltransduktion beteiligten Strukturen wurden bisher nur vereinzelt beobachtet (z. B. Veränderung der  $\alpha 3/\beta 2M$ -Paarung nach TCR-

Ligation: Garcia et al., 1998), und ihre Bedeutung ist noch weitgehend unklar. Obwohl stabile TCR/pMHC-Multimere gebildet werden können (Reich et al., 1997), werden Modelle, die von einer TCR/pMHC-Dimerisation ausgehen (z. B. Germain, 1993; Fields et al., 1995; Fremont et al., 1996), durch Röntgenstrukturanalysen nicht gestützt. Die Röntgenstrukturanalyse des humanen  $\alpha\beta$ TCR B7, komplexiert mit HLA-A2/Tax Peptid, zeigte keine bindungsinduzierten Änderungen der TCR-Konformation (Ding et al., 1998). Auch die Beobachtung, daß Agonisten schnellere on- und off-rates als Antagonisten besitzen, Liganden, die TCR-Konformationsänderungen bewirken, jedoch langsame on- und off-rates besitzen sollten, spricht gegen qualitative Modelle (Alam et al., 1996 und 1999).

Welchen relativen Beitrag besitzen MHC-Molekül und MHC-präsentiertes Peptid bei der positiven Selektion? Hogquist et al. zeigten 1994 bei  $\alpha\beta$ TCR transgenen Mäusen, daß ein mit dem nominalen Peptid des TCR verwandtes Peptid positiv in  $\beta_2M(-/-)$  Mäusen und (bei gleicher Konzentration) negativ in  $\beta_2M(-/+)$  Mäusen selektionieren konnte (FTOC; TCR-Spezifität: H-2K<sup>b</sup>/Ovalbumin 257-264). Die Autoren leiteten ab, daß der Beitrag des Peptids zur positiven Selektion in diesem Modell über den der bloßen Stabilisierung des MHC-Moleküls auf der Zelloberfläche („Stabilitätsmodell“) oder des „Nicht-Verhinderns“ des TCR/MHC-Molekül-Kontakts („steric hindrance model“: Schumacher et al., 1994) hinausginge. Weiterhin wurde postuliert, daß die positive Selektion von Thymozyten empfindlich für eine extrem niedrige Ligandendichte und ausschließlich peptidspezifisch sei („Spezifitätsmodell“). Unter Peptidspezifität wurde dabei verstanden, daß jeder TCR einen sehr begrenzten Peptidsatz oder sogar nur einen definierten pMHC benötigte, um positiv selektioniert zu werden (Hogquist et al., 1994; s. Kap. 1.5). Peptidketten, die zur Selektion beitragen, ragen aus dem peptidbindenden Spalt des MHC-Moleküls heraus, was ebenfalls für einen direkten Beitrag des Peptids zur Spezifität der positiven Selektion spricht. Komplexe Peptidgemische selektionieren mehr T-Zellen als einzelne Peptide, wenn die Konzentrationen von Peptid bzw. Peptidgemisch gleich gewählt werden (Hogquist et al., 1993; Ashton-Rickardt et al., 1993).

Hinweise für peptidspezifische Selektion von CD8 T-Zellen durch direkte Interaktion des TCR mit dem Peptid beschrieben auch Ashton-Rickardt et al. 1993 bei nicht-

transgenen TAP1 (-/-) Mäusen und 1994 bei  $\alpha\beta$ TCR transgenen TAP1 (-/-) Mäusen (FTOC; TCR-Spezifität: H-2K<sup>d</sup>/LCMV-Peptid). LCMV-Peptid induzierte positive Selektion, wenn es in einer Konzentration von 10  $\mu$ M - 100  $\mu$ M vorlag, während zwei nur in einer AS von LCMV differierende Peptide, die H-2K<sup>d</sup> ebenso wie LCMV auf der Zelloberfläche stabilisieren konnten, nicht positiv selektionieren konnten.

Der Beitrag des MHC-Moleküls zur positiven Selektion wurde bisher weniger analysiert. Bevan et al. (1994) sowie Schuhmacher und Ploegh (1994) wiesen darauf hin, daß die Detektion einer MHC-spezifischen Selektion durch Interaktionen von niedriger Affinität zwischen TCR und in hoher Dichte vorhandener MHC-Komplex-Epitope in Modellen, von denen eine ausschließliche Peptidspezifität der Selektion abgeleitet wurde, häufig ausgeschlossen war. Hinweise für eine entscheidende Bedeutung des direkten Kontakts des TCR mit MHC-Molekül-Determinanten existieren. Die Überrepräsentation von V $\alpha$ -Segmenten in CD4- oder CD8-Kompartiment wurde bereits erwähnt. Die Unterbindung von N-Nukleotidinsertionen in TdT-defizienten Mäusen führt zu reduzierter Peptid-Spezifität und gleichzeitig zu erhöhter MHC-Molekül-Affinität des TCR (Gavin und Bevan, 1995). Mäuse, deren MHC-Klasse-II-Moleküle nur ein einziges Peptid präsentieren (nach H-2M Deletion oder in einem transgenen Modell mit kovalent gebundenem Peptid), besitzen ein hochdiverses TCR-Repertoire (Miyazaki et al., 1996, Martin et al., 1996, Fung-Leung et al., 1996). Ihre TCR erkennen einen diversen endogenen Peptidsatz, präsentiert von MHC-kongenem Wildtyp APC, und zeigen erhöhte MHC-Reaktivität (Ignatowicz et al., 1996).

Das hier verwendete Modell der RT1f-spezifischen Überselektion von TCR V $\alpha$ 8.2, in dem einem MHC-Molekül ein entscheidender Beitrag während der positiven Selektion zukommt, wurde in zwei Rattenstämmen untersucht (Torres-Nagel et al., 2001). Das V $\alpha$ 8.2-Segment der Sprague Dawley (SD) Ratte (MHC-Haplotyp f; V $\alpha$ 8.2sd) differiert in zwei Nukleotiden und dadurch auch in zwei AS vom V $\alpha$ 8.2-Segment der LEW.1F Ratte (MHC-Haplotyp f; V $\alpha$ 8.2l). Eine dieser AS (Position 65) liegt weit vom TCR/MHC-Molekül-Interaktionsbereich entfernt, die zweite AS befindet sich in der CDR2 $\alpha$ -Region. Die AS-Sequenzen des RT1A<sup>f</sup> sind bei SD und LEW.1F Ratte identisch. RT1A<sup>f</sup> überselektioniert sowohl V $\alpha$ 8.2sd+ als auch V $\alpha$ 8.2l+ T-Zellen in gleichem Ausmaß, trotz der Differenz der CDR2 $\alpha$ -Schleife. V $\alpha$ 8.2l+ und V $\alpha$ 8.2sd+

CD8 T-Zellen reagieren mit 10- bzw. 16-facher Expansion auf Allostimulation mit RT1A<sup>f</sup>, die Expansion liegt also ebenfalls in gleicher Größenordnung. Die 13 anderen V $\alpha$ 8-Familienmitglieder werden durch RT1A<sup>f</sup> insgesamt nur mäßig überselektioniert, nämlich insgesamt um den Faktor zwei.

RT1A<sup>a</sup> überselektioniert V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen nicht und bewirkt auch keine bevorzugte alloreaktive Expansion von V $\alpha$ 8.2+ T-Zellen. RT1A<sup>f</sup> ist eng verwandt mit RT1A<sup>a</sup>, von dem es sich in der extrazellulären Domäne nur in sieben AS unterscheidet. Nur vier dieser differierenden AS wiederum sind vermutlich an der TCR-Erkennung beteiligt (Joly et al., 1998). Für RT1A<sup>f</sup> und RT1A<sup>a</sup> werden identische Peptidspezifitäten postuliert, da drei peptidbindende Taschen identisch sind und die vierte nur in zwei AS variiert (Matsumura et al., 1992; Fremont et al., 1995). Dies spricht dagegen, daß die starke Überselektion von V $\alpha$ 8.2 durch RT1A<sup>f</sup>, aber nicht durch RT1A<sup>a</sup>, durch Interaktion mit unterschiedlichen MHC-präsentierten Peptiden bedingt, also peptidspezifisch, ist. Keine der sieben zwischen RT1A<sup>f</sup> und RT1A<sup>a</sup> differierenden Aminosäuren kontaktiert CDR2 $\alpha$ . V $\alpha$ 8.2l unterscheidet sich von den nicht-überselektionierten V $\alpha$ 8-Familienmitgliedern in der CDR2 $\alpha$ -Schleife in einem Nukleotid, V $\alpha$ 8.2sd unterscheidet sich nicht von der Konsensus-CDR2 $\alpha$ -Sequenz. Dies spricht gegen einen entscheidenden Beitrag von CDR2 $\alpha$  zu V $\alpha$ 8.2-spezifischer positiver Selektion und Alloreaktivität. Auf Röntgenstrukturanalysen basierende Computermodelle sprechen dafür, daß Glutamat-62 und Serin-167 des RT1A<sup>f</sup> bzw. Glutamin-62 und Tryptophan-167 des RT1A<sup>a</sup> die CDR1 $\alpha$ -Schleife kontaktieren. Diese AS ragen aus dem MHC-Molekül heraus in Richtung des TCR. Die CDR1 $\alpha$ -Schleifen des V $\alpha$ 8.2l und des V $\alpha$ 8.2sd unterscheiden sich von den nicht-überselektionierten V $\alpha$ 8-Familienmitgliedern in zwei Aminosäuren in gleicher Weise (T→A27, N→D30). Diese könnten an der Erkennung der AS der Positionen 62 und 167 der RT1A-Moleküle beteiligt sein. Der Überselektion und Alloreaktivität bewirkende Kontakt zwischen V $\alpha$ 8.2 und RT1A<sup>f</sup> wurde somit auf zwei AS der CDR1 $\alpha$ -Region eingegrenzt. Wie stark drei weitere V $\alpha$ 8-Familienmitglieder, welche eine identische CDR1 $\alpha$ -Sequenz wie V $\alpha$ 8.2 besitzen, RT1f-spezifisch überselektioniert werden, wurde bisher nicht untersucht. Die RT1f-spezifische Überselektion von V $\alpha$ 8.2 scheint also primär durch die CDR1 $\alpha$ -Schleife vermittelt zu

werden, und die Beobachtungen sprechen gegen eine ausschließliche Peptidspezifität der positiven Selektion.

Der relative Beitrag der Interaktionen von CDR3-Schleife und Peptid einerseits und TCR V-Segment und MHC-Molekül andererseits zur Gesamtbindungsstärke bei der positiven Selektion variiert also zwischen den einzelnen experimentellen Systemen. Die Rekonstitution einer low-level-MHC-Expression durch Zugabe von exogenen Peptiden zu FTOC von TAP(-/-) oder  $\beta_2M(-/-)$  Mäusen kann die CDR3/Peptid-Interaktion zum wichtigeren Faktor werden lassen. Die Unterbindung von N-Nukleotidinsertionen in TdT-defizienten Mausmodellen läßt die (CDR1,CDR2)/MHC-Molekül-Interaktion wichtiger werden, und T-Zellen, die durch nur ein definiertes pMHC selektioniert wurden, besitzen bei erhöhter Alloreaktivität überraschend viele TCR-Spezifitäten. Die Vorstellung von differenzierten Beiträgen multipler TCR/pMHC-Kontakte zum Triggern von T-Zellen ist vereinbar mit den komplementären Struktureigenschaften von pMHC und TCR V-Domänen (Bevan et al., 1984 und 1994; Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde anhand der Interaktion von RT1A<sup>f</sup> und TCR V $\alpha$ 8.2 gezeigt, daß ein einziges V $\alpha$ -Segment sowohl MHC-Restriktion (dabei addiert sich ein MHC-allelspezifischer zu einem MHC-klassenspezifischen Effekt) als auch Alloreaktivität vermittelt, wobei die Alloreaktion stärker von einem zusätzlichen Beitrag der CDR3 $\alpha$ -Schleife anhängig ist, deren Gestaltung (kurz, flexibel, wenige N-Nuklidinsertionen, hydrophob/amphiphiles Motiv) wahrscheinlich Kontakte mit einem hochdiversen Peptidsatz oder zusätzliche MHC-Molekül-Kontakte und damit eine Aviditätszunahme ermöglicht. Der TCR V $\beta$ -Beitrag zur Spezifität der V $\alpha$ 8.2-vermittelten RT1f-spezifischen positiven Selektion und Alloreaktivität ist allenfalls gering. Dies steht im Einklang mit 3D-Röntgenstrukturanalysen von MHC-Klasse-I-Molekülen im Komplex mit Peptid und TCR, die zeigen, daß CDR1 $\alpha$  und CDR2 $\alpha$  die stärksten Kontakte zum MHC-Molekül ausbilden, indem sie sowohl konservierte als auch polymorphe Epitope der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Helices des MHC-Moleküls erkennen, während CDR3 die Hauptkontakte zum Peptid vermittelt (Garcia et al., 1996, Garboczi et al., 1996, Ding et al., 1998; Degano et al., 2000; s. Kap. 1. 6).



Die Überselektion von V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen durch RT1A<sup>f</sup> ist das dramatischste bisher beobachtete Beispiel einer Verstärkung einer schwachen MHC-klassenspezifischen Überselektion eines V $\alpha$ -Segments (ins CD8-Kompartiment) durch zusätzliche MHC-allelspezifische Überselektion. Da bei V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F CD8 T-Zellen nur geringe Restriktionen von J $\alpha$ -Gebrauch und CDR3 $\alpha$ -Komposition gefunden wurden, beruht die Überselektion von TCR V $\alpha$ 8.2 durch RT1A<sup>f</sup> wahrscheinlich auf einem besonders guten Kontakt, einer hervorragenden Komplementarität, zwischen RT1A<sup>f</sup> und CDR1 $\alpha$ /CDR2 $\alpha$ .

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit Röntgenstrukturanalysen des TCR/pMHC-Komplexes (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996) und stützen das „differential avidity model“ der TCR-vermittelten Antigenerkennung in der thymischen Selektion und der Aktivierung reifer T-Zellen (Ashton-Rickardt und Tonegawa, 1994). Sie belegen die Bedeutung der Interaktion des TCR mit polymorphen MHC-Strukturen und sprechen gegen eine ausschließliche Peptidspezifität, die für Alloreaktionen und positive Selektion postuliert wurde (Ashton-Rickardt et al., 1994; Sebzda et al., 1994).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

V $\alpha$ 8+ (mAk G177+) CD8 T-Zellen von LEW.1F Ratten, die den MHC-Haplotyp f exprimieren (RT1A<sup>f</sup>), werden während der Reifung im Thymus zehnfach überselektioniert. 14,0% der reifen CD8 T-Zellen dieses Stammes, aber nur 0,8% – 2,4% der CD8 T-Zellen von sieben RT1f-negativen Stämmen, sind mAk G177+. Das Verhältnis von mAk G177+ CD8 T-Zellen zu mAk G177+ CD4 T-Zellen beträgt bei den RT1f-negativen Stämmen zwei bis drei, bei der LEW.1F Ratte dagegen 10. Gleichzeitig führt die allogene Stimulation reifer CD8 T-Zellen RT1f-negativer Ratten (LEW, LEW.1A) mit RT1A<sup>f</sup> zu einer bevorzugten Expansion von mAk G177+ T-Zellen (Torres-Nagel et al., 1994).

Nach heute gängigen Modellvorstellungen wird die positive Selektion unreifer Thymozyten durch eine niedriger avide Interaktion zwischen TCR und pMHC vermittelt als die Aktivierung reifer peripherer T-Zellen z. B. durch fremde MHC-Moleküle („Alloreaktivität“). Zur Avidität der Interaktion tragen sowohl die intrinsische Affinität zwischen TCR und pMHC als auch die pMHC-Dichte bei („differential-avidity model“: Ashton-Rickardt und Tonegawa, 1994).

Die variablen Domänen der TCR  $\alpha$ -Ketten von RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8+ LEW CD8 T-Zellen wurden auf Nukleotid- und abgeleiteter Aminosäureebene analysiert und mit variablen Domänen der TCR  $\alpha$ -Ketten RT1f-spezifisch im Thymus positiv selektionierter V $\alpha$ 8+ LEW.1F CD8 T-Zellen sowie nicht allogenen stimulierter V $\alpha$ 8+ LEW CD8 T-Zellen verglichen.

200 unabhängige TCR $\alpha$ -Transkripte aus mAk G177+ CD8 T-Zellen (LEW und LEW.1F) benutzten ausschließlich das V $\alpha$ 8-Familienmitglied V $\alpha$ 8.2. Die mit Hilfe des mAk G177 beobachtete RT1f-spezifische positive Selektion im Thymus und die RT1f-spezifische Alloreaktion wurden somit stets durch dasselbe V $\alpha$ 8-Familienmitglied vermittelt, nämlich V $\alpha$ 8.2.

Weder bei RT1f-spezifischer positiver Selektion noch bei RT1f-spezifischer Alloreaktion wurde ein bevorzugter Gebrauch bestimmter V $\beta$ -Ketten des V $\alpha$ 8.2+  $\alpha\beta$ TCR nachgewiesen.

Der Gebrauch von J $\alpha$ -Segmenten der RT1f-alloreaktiven V $\alpha$ 8.2+ LEW T-Zellen war restringiert. 36% der cDNA-Klone benutzten nicht zufällig gewählte, verwandte J $\alpha$  Segmente ( $p \geq 99,69\%$ ). 46% der cDNA-Klone benutzten nur drei J $\alpha$ -Segmente. Die Mehrheit (20/23) dieser drei bevorzugten J $\alpha$ -Segmente besaß ein CDR3 $\alpha$ -Motiv mit einer die Flexibilität des TCR erhöhenden AS im Zentrum des CDR3 $\alpha$  zwischen mindestens einer hydrophoben AS V-proximal und einer amphiphilen AS C-proximal. Die CDR3 $\alpha$ -Schleifen waren kurz, flexibel und besaßen somit wahrscheinlich eine hohe Peptidpromiskuität; ihre Längenverteilung war homogen. N-Nukleotidinsertionen (V $\alpha$ /J $\alpha$ ) wurden signifikant seltener gefunden als bei nicht allostimulierten LEW oder bei RT1f-spezifisch selektionierten V $\alpha$ 8.2+ CD8 T-Zellen. Eine so gestaltete CDR3 $\alpha$ -Schleife könnte die Interaktion des  $\alpha\beta$ TCR mit vielgestaltigen MHC-präsentierten Peptiden erlauben oder zusätzliche direkte Kontakte mit dem MHC-Molekül vermitteln und so eine Zunahme der Avidität bewirken. Ein hydrophobes Motiv und ein restringierter J $\alpha$ -Gebrauch wurden bei nicht RT1f-alloreaktiven LEW CD8 T-Zellen nicht gefunden.

Der Gebrauch von J $\alpha$ -Segmenten der V $\alpha$ 8.2+ LEW.1F T-Zellen war weit weniger restringiert, nur 16% der J $\alpha$ -Segmente waren RT1f-spezifisch überselektioniert ( $p \geq 99,69\%$ ). Die CDR3 $\alpha$ -Schleifen waren länger und ihre Längenverteilung heterogener. Ein Motiv der CDR3 $\alpha$ -Region, das Flexibilität und Promiskuität des TCR erhöhen könnte, wurde seltener gefunden (22% vs. 40%).

Während der Analysen wurden zehn neue J $\alpha$ -Segmente der Ratte auf cDNA-Ebene identifiziert.

Somit vermittelt ein einziges V $\alpha$ -Segment, V $\alpha$ 8.2, sowohl MHC-Restriktion als auch Alloreaktivität. Für die Alloreaktion ist zusätzlich der Beitrag der CDR3 $\alpha$ -Schleife wichtig, deren Gestaltung wahrscheinlich Kontakte mit einem hochdiversen Peptidsatz und zusätzliche MHC-Molekül-Kontakte ermöglicht. Unsere Ergebnisse sind vereinbar mit Röntgenstrukturanalysen des TCR/pMHC-Komplexes und dem „differential-avidity model“ der TCR-vermittelten Antigenerkennung bei thymischer Selektion und Aktivierung reifer T-Zellen. Sie dokumentieren die Bedeutung der Erkennung polymorpher MHC-Strukturen durch keimbahnkodierte TCR-Segmente und sprechen gegen eine ausschließliche Peptidspezifität von positiver Selektion und Alloreaktivität.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Äbischer**, T., S. Oehen und H. Hengartner. 1990. Preferential usage of V alpha 4 and V beta 10 T cell receptor genes by lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein-specific H-2D<sup>p</sup>-restricted cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol.*; 20(3): 523-31
- Alam**, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Naholds, S. Redpath, S. C. Jameson und N. R. J. Gascoigne. 1996. T cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature*; 381(6583): 616-20
- Alam**, S. M., G. M. Davies und C. M. Lin. 1999. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity*; 10(2): 227-37
- Amit**, A. G., R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips und R. J. Poljak. 1986. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science*; 233(4765): 747-53
- Anderson**, G., J. J. T. Owen, N. C. Moore und E. J. Jenkinson. 1994. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+ CD8+ thymocytes in vitro. *J. Exp. Med.*; 179(6): 2027-31
- Anderson**, G., K. M. Partington und E. J. Jenkinson. 1998. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J. Immunol.*; 161(12): 6599-603
- Anderson**, A., K. J. Hare und E. J. Jenkinson. 1999. Positive selection of thymocytes: the long and winding road. *Immunol. Tod.*; 20(10): 463-8
- Arden**, B., S. P. Clark, D. Kabelitz und T. W. Mak. 1995. Mouse T cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*; 42(6): 501-30
- Ashton-Rickardt**, P. G., L. Van Kaer, T. N. M. Schumacher, H. L. Ploegh und S. Tonegawa. 1993. Peptides contribute to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Cell*; 73(5): 1041-9
- Ashton-Rickardt**, P. G. und S. Tonegawa. 1994. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol. Tod.*; 15(8): 362-6
- Ashton-Rickardt**, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H.-P. Pircher, R. M. Zinkernagel und S. Tonegawa. 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*; 76(4): 651-63
- Attal**, J., C. Puissant und L. M. Houdebine. 1990. An improvement of a rapid method using Qiagen columns to purify plasmids. *Biotechniques*; 8(3): 269-71
- Ausubel**, L. J., C. K. Kwan, A. Sette, V. Kuchroo und D. A. Hafler. 1996. Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 93(26): 15317-22
- Azuma**, M., M. Cayabyab, D. Buck, J. H. Phillips und L. L. Lanier. 1992. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 175(2): 353-60
- Babbitt**, B. P., P. M. Allen, G. Matsueda, E. Haber und E. Unanue. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility complex. *Nature*; 317(6035): 359-61
- Bachmann**, F. und P. S. Ohashi. 1999. The role of T-cell receptor dimerization in T-cell activation. *Immunol. Tod.*; 20(12): 568-75
- Baldwin**, K. K., P. A. Reay, L. Wu, A. Farr und M. M. Davis. 1999. A T cell receptor-specific blockade of positive selection. *J. Exp. Med.*; 189(1): 13-24
- Barton**, G. M. und A. Y. Rudensky. 1999. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science*; 283(5398): 67-70
- Beeson**, C., J. Rabinowitz, K. Tate, I. Gutgemann, P. Chien, P. Jones, M. M. Davis und H. M. McConnell. 1996. Early biochemical signals arise from low affinity TCR-ligand reactions at the cell-cell interface. *J. Exp. Med.*; 184(2): 777-782
- Bentley**, G. A., G. Boulot, K. Karjalainen und R. A. Mariuzza. 1995. Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor. *Science*; 267(5206): 1984-7
- Bevan**, M. J. 1975. The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.*; 142(6): 1349-64
- Bevan**, M. J. 1977. Killer cells reactive to altered self antigens can also be alloreactive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 74(5): 2094-8
- Bevan**, M. J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol. Tod.*; 5: 128-30
- Bevan**, D. J. und P. M. Chisholm. 1986. Co-expression of CD4 and CD8 molecules and de novo expression of MHC class II antigens on activated rat T cells. *Immunology*; 59(4): 621-5

- Bevan, M. J., K. A. Hogquist und S. C. Jameson.** 1994. Selecting the T cell receptor repertoire. *Science*; 264(5160): 796-7
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger und D. C. Wiley.** 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*; 329(6139): 506-12
- Blackman, M. A., P. Marrack und J. Kappler.** 1989. Influence of the major histocompatibility complex on positive thymic selection of V $\beta$ 17a+ T cells. *Science*; 244(4901): 214-7
- Blackman, M., J. Kappler und P. Marrack.** 1990. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science*; 248(4961): 1335-41
- von Boehmer, H.** 1988. The developmental biology of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*; 6: 309-26
- von Boehmer, H.** 1990. Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.*; 8: 531-56
- von Boehmer, H.** 1992. T cell development and selection in the thymus. *Bone Marrow Transplant*; 9 Suppl. 1: 46-8
- von Boehmer, H.** 1994. Positive selection of lymphocytes. *Cell*; 76(2): 219-228
- von Boehmer, H. und H. J. Fehling.** 1997. Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.*; 15: 433-52
- De Boer, N. K., W. A. Ammerlaan, B. Meedendor und F. G. Kroese.** 1992. CD5 B cells in the rat? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 651: 157-9
- Bogue, M., S. Candeias, C. Benoist und D. Mathis.** 1991. A special repertoire of  $\alpha$ : $\beta$  T cells in neonatal mice. *EMBO J.*; 10(12): 3647-54
- Boniface, J. J., J. D. Rabinowitz, C. Wulfiging, J. Hampl, Z. Reich, J. D. Altman, R. M. Kantor, C. Beeson, H. M. McConnell und M. M. Davis.** 1998. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity*; 9(4): 459-66
- Born, W., J. Yagüe, E. Palmer, J. Kappler und P. Marrack.** 1985. Rearrangement of T-cell receptor  $\beta$ -chain genes during T-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 82(9): 2925-9
- Brideau, R. J., P. B. Carter, W. R. McMaster, D. W. Mason und A. F. Williams.** 1980. Two subsets of T-lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*; 10(8): 609-15
- Broker, B. M., M. D. Smith, S. Yoshino, P. M. Lydyard und F. Emmrich.** 1991. Do gamma delta T cells play an important role in autoimmune disease? *Behring Inst. Mitt.*; 88: 43-51
- Butcher, G. W. und J. C. Howard.** 1986. The MHC of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Handbook of Experimental Immunology*. Vol. 3. L. Herzenberg und D. M. Weir (editors). Blackwell Scientific Publications, Oxford. S. 101.1
- Candeias, S., C. Waltzinger, C. Benoist und D. Mathis.** 1991. The V $\beta$ 17+ T cell repertoire: skewed J $\beta$  usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *J. Exp. Med.*; 174(5): 989-1000
- Cantrell, D. A., A. A. Davies und M. J. Crumpton.** 1985. Activators of protein kinase C down-regulate and phosphorylate the T3/T cell antigen receptor complex of human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 82(23): 8158-61
- Cantrell, D.** 1998. The real LAT steps forward. *Trends Cell. Biol.*; 8(5): 180-2
- Casanova, J.-L., F. Martinon, H. Gournier, C. Barra, C. Pannetier, A. Regnault, P. Kourilsky, J.-C. Cerottini und J. L. Maryanski.** 1993. T cell receptor selection by and recognition of two class I major histocompatibility complex-restricted antigenic peptides that differ at a single position. *J. Exp. Med.*; 177(3): 811-20
- Celia, H., E. Wilson-Kubalek, R. A. Milligan und L. Teyton.** 1999. Structure and function of a membrane-bound murine MHC class I molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 96(10): 5634-9
- Chan, A. und T. W. Mak.** 1989. Genomic organization of the T cell receptor. *Cancer Detect. Prev.*; 14(2): 261-7
- Chan, S. H., D. Cosgrove, C. Waltzinger, C. Benoist und D. Mathis.** 1993. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell*; 73(2): 225-36
- Chan, A. C. und A. S. Shaw.** 1996. Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Opin. Immunol.*; 8(3): 394-401
- Chang, H. C., T. Moriuchi und J. Silver.** 1983. The heavy chain of human B-cell alloantigen HLA-DS has a variable N-terminal region and a constant immunoglobulin-like region. *Nature*; 305(5937): 813-5
- Chothia, C., D. R. Boswell und A. M. Lesk.** 1988. The outline structure of the T cell  $\alpha\beta$  receptor. *EMBO J.*; 7(12): 3745-55
- Christinck, E. R., M. A. Luscher, B. H. Barber und D. B. Williams.** 1991. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature*; 352(6330): 67-70
- Clark, S. P.** 1992. MALIGNED: a multiple sequence alignment editor. *Comput. Appl. Biosc.*; 8: 535

- Claverie**, J. M., A. Prochnicka-Chalufour und L. Bougueleret. 1989. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol. Tod.*; 10(1): 10-4
- Cockfield**, S. M. und P. F. Halloran. 1989. A view from the groove: peptide binding by MHC molecules and the implications for regional immune responses. *Reg. Immunol.*; 2(4): 266-72
- Coen**, E. S., Carpenter R. und C. Martin. 1986. Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*. *Cell*; 47(2): 285-96
- Collins**, E. J., D. N. Garboczi, M. N. Karpusas und D. C. Wiley. 1995. The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the alpha 3 domain of the heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 92(4): 1218-21
- Crowe**, J. S., H. J. Cooper, M. A. Smith, D. Parker und D. Gewert. 1991. Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase K digestion. *Nucleic Acids Res.*; 19(1): 184
- Davis** C. B., N. Killeen, M. E. Crooks, D. Raulet und D. R. Littman. 1993. Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell*; 73(2): 237-47
- Davis**, M. 1988. T cell receptor genes. *Molecular Immunology*. B. Hames und D. Glover (editors). IRL Press, Oxford. S. 61-79
- Davis**, M. M. und P. J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*; 334(6181): 395-402
- Degano**, M., K. C. Garcia, V. Apostolopoulos, M. G. Rudolph, L. Teyton und I. A. Wilson. 2000. A functional hot spot for antigen recognition in a superagonist TCR/MHC complex. *Immunity*; 12(3): 251-61
- Demotz**, S., H. M. Grey und A. Sette. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science*; 249(4972):1028-30
- DerSimonian**, H., H. Band und 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(5): 639-48
- Dianzani**, U., A. Shaw, B. K. al-Ramadi, R. T. Kubo und C. A. Janeway. 1992. Physical association of CD4 with the T cell receptor. *J. Immunol.*; 148(3): 678-88
- Ding**, Y. H., K. J. Smith, D. N. Garboczi, U. Utz, W. E. Biddison und D. C. Wiley. 1998. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different T cell receptor amino acids. *Immunity*; 8(4): 403-11
- Ding**, Y. H., B. M. Baker, D. N. Garboczi, W. E. Biddison und D. C. Wiley. 1999. Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity*; 11(1): 45-56
- Dustin**, M. L., J. M. Miller, S. Ranganath, D. A. Vignali, N. J. Viner, C. A. Nelson und E. R. Unanue. 1996. TCR-mediated adhesion of T cell hybridomas to planar bilayers containing purified MHC class II/peptide complexes and receptor shedding during detachment. *J. Immunol.*; 157(5): 2014-21
- Dustin**, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Meerwe, P. M. Allen und A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*; 94(5): 667-77
- Dyall**, R. und J. Nikolic-Zugic. 1995. The majority of postselection CD4+ single-positive thymocytes requires the thymus to produce long-lived, functional T cells. *J. Exp. Med.*; 181(1): 235-45
- Egerton**, M., R. Scollay und K. Shortman. 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 87(7): 2579-82
- Elbe**, A., O. Kilgus, T. Hünig und G. Stingl. 1995. T-cell receptor diversity in dendritic epidermal T-cells in the rat. *J. Invest. Dermatol.*; 102(1): 74-9
- Elliott**, J. I. und D. M. Altmann. 1995. Dual T cell receptor alpha chain T cells in autoimmunity. *J. Exp. Med.*; 182(4): 953-9
- Epplen**, J. T., J. Chluba, C. Hardt, A. Hinkkanen, V. Steimle und H. Stockinger. 1987. Mammalian T-lymphocyte antigen receptor genes: genetic and nongenetic potential to generate variability. *Hum. Genet.*; 75(4): 300-10
- Ernst**, B., C. D. Surh und J. Sprent. 1996. Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J. Exp. Med.*; 183(3): 1235-40
- Falk**, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung und H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*; 351(6324): 290-6
- Favero**, J. und V. Lafont. 1998. Effector pathways regulating T cell activation. *Biochem. Pharmacol.*; 56(12): 1539-47
- Fields**, B. A., B. Ober, E. L. Malchiodi, M. I. Levedeba, B. C. Braden, X. Ysern, J.-K. Kim, X. Shao, E. S. Ward und R. A. Mariuzza. 1995. Crystal structure of the V $\alpha$  domain of a T cell antigen receptor. *Science*; 270(5243): 1821-4

- Finco**, T. S., T. Kadlecsek, W. Zhang, L. E. Samelson und A. Weiss. 1998. LAT is required for TCR-mediated activation of PLC $\gamma$ 1 and the Ras pathway. *Immunity*; 9(5): 617-26
- Finco**, T. S., D. Yablonski, J. Lin und A. Weiss. 1999. The adapter proteins LAT and SLP-76 are required for T-cell activation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 64: 265-74
- Folch**, G. und M. P. Lefranc. 2000. The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp. Clin. Immunogenet.*; 17(1): 42-54 (<http://imgt.cines.fr:8104>)
- Ford**, W. L., S. J. Simmonds und R. C. Atkins. 1975. Early cellular events in a systemic graft versus host reaction. II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex. *J. Exp. Med.*; 141(3): 681-96
- Fowlkes**, B. J. und D. M. Pardoll. 1989. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.*; 44: 207-64
- Frank**, S. J., L. E. Samelson und R. D. Klausner. The structure and signalling functions of the invariant T cell receptor components. *Semin. Immunol.*; 2(2): 89-97
- Fremont**, D. H., E. A. Stura, M. Matsumura, P. A. Peerson und I. A. Wilson. 1995. Crystal structure of an H-2K<sup>b</sup>-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 92(7): 2479-83
- Fremont**, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack und J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science*; 272(5264): 1001-4
- Fung-Leung**, W.-P., C. D. Surh, M. Liljedahl, J. Pang, D. Leturcq, P. A. Peterson, S. R. Webb und L. Karlsson. 1996. Antigen presentation and T cell development in H-2M deficient mice. *Science*; 271(5253): 1278-81
- Gabor**, M. J., D. I. Godfrey und R. Scollay. 1997. Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes. *Eur. J. Immunol.*; 27(8): 2010-5
- Gao**, G. F., J. Tormo, U. C. Gerth, J. R. Wyer, A. J. McMichael, D. I. Stuart, J. I. Bell, E. Y. Jones und B. K. Jakobsen. 1997. Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha$ ( $\alpha$ ) and HLA-A2. *Nature*; 387(6633): 630-4
- Garboczi**, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison und D. C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T cell receptor viral peptide and HLA-A2. *Nature*; 384(6605): 134-41
- Garboczi**, D. N., U. Utz, P. Ghosh, A. Seth, J. Kim, E. A. VanTienhoven, W. E. Biddison und D. C. Wiley. 1996. Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR- $\alpha$  chain with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J. Immunol.*; 157(12): 5403-10
- Garcia**, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton und I. A. Wilson. 1996. An  $\alpha\beta$  T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*; 274(5285): 209-19
- Garcia**, K. C., M. Degano, L. R. Pease, M. Huang, P. A. Peterson, L. Teyton und I. A. Wilson. 1998. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self-peptide-MHC antigen. *Science*; 279(5354): 1166-72
- Garcia**, K. C., L. Teyton und I. A. Wilson. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.*; 17: 369-97
- Garman**, R. D., J.-L. Ko, C. D. Vulpe und D. H. Raulet. 1986. T cell receptor variable region gene usage in T cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 83(11): 3987-91
- Gavin**, M. A. und M. J. Bevan. 1995. Increased peptide promiscuity provides a rationale for the lack of N regions in the neonatal T cell repertoire. *Immunity*; 3(6): 793-800
- Germain**, R. 1993. Seeing double. *Curr. Biol.*; 3: 586-9
- Germain**, R. N. 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr. Biol.*; 7(10): 640-4
- Giegerich**, G., M. Stangel, N. Torres-Nagel, T. Hünig und K. V. Toyka. 1995. Sequence and diversity of rat T cell receptor Tcr $\alpha$  V8 gene segments. *Immunogenetics*; 42(4): 304-5
- Gilliland**, G., S. Perrin, K. Blanchard und H. F. Bunn. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 87(7): 2725-9
- Gold**, R., G. Giegerich, H.-P. Hartung und K. V. Toyka. 1995. T cell receptor usage in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis: TCR  $\beta$  chain variable region V $\beta$ 8.2 positive T cells are not essential for induction and course of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 92(13): 5850-4
- Gold**, R., M. Schmied, U. Tontsch, H. P. Hartung, H. Wekerle, K. V. Toyka und Lassmann H. 1996. Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo. *Brain*; 119 (2): 651-9

- Gold, R., J. Zielasek, R. Kiefer, K. V. Toyka und H. P. Hartung.** 1996. Secretion of nitrite by Schwann cells and its effect on T-cell activation in vitro. *Cell Immunol.*; 168(1): 69-77
- Goss, J. A., R. Pyo, M. Wayne-Flye, J. M. Connolly und T. H. Hansen.** 1993. Major histocompatibility complex-specific prolongation of murine skin and cardiac allograft survival after in vivo depletion of V $\beta$ + T cells. *J. Exp. Med.*; 177(1): 35-44
- Gough, N. M.** 1988. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal. Biochem.*; 173(1): 93-5
- Groh, V., F. Porcelli, M. Fabbi, L. L. Lanier, L. J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger und M. B. Brenner.** 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma/\delta$  are phenotypically diverse and evenly distribute throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.*; 169(4): 1277-94
- Groves, T., M. Parsons, N. G. Miyamoto und C. J. Guidos.** 1997. TCR engagement of CD4+ CD8+ thymocytes in vitro induces early aspects of positive selection, but not apoptosis. *J. Immunol.*; 158(1): 65-75
- Guy-Grand, D., N. Cerf-Bensussan, B. Malissen, M. Malassis-Seris, C. Briotett und P. Vassalli.** 1991. Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J. Exp. Med.*; 173(2): 471-81
- Hahn, S., R. Gehri und P. Erb.** 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol. Rev.*; 146: 57-79
- Harding C. V. und E. R. Unanue.** 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature*; 346(6284): 574-6
- Hare, K. J., R. W. Wilkinson, E. J. Jenkinson und G. Anderson.** 1998. Identification of a developmentally regulated phase of postselection expansion driven by thymic epithelium. *J. Immunol.*; 160(8): 3666-72
- Harris, N. L. und F. Ronchese.** The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol. Cell. Biol.*; 77(4): 304-11
- Heath, W. R., M. E. Hurd, F. R. Carbone und L. A. Sherman.** 1989. Peptide dependant recognition of H-2K<sup>b</sup> by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature*; 341(6244): 749-52
- Heath, W. R., K. P. Kane, M. Mescher und L. A. Sherman.** 1991. Alloreactive T cells discriminate between a diverse set of endogenous peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 88(12): 5101-5
- Herman, A. J., W. Kappler, P. Marrack und A. M. Pullen.** 1991. Superantigens: mechanism of T cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*; 9: 745-72
- Herrmann, T., K. Hofmann, N. E. Nagel, A. Asmuss, T. Hunig und K. Wonigeit.** 1999. Differential CD4/CD8 subset-specific expression of highly homologous rat Tcrb-V8 family members suggests a role of CDR2 and/or CDR4 (HV4) in MHC class-specific thymic selection. *Int. Immunol.*; 11(3): 435-44
- Hinkkanen, A. E., J. Maata, Y.-F. Qin, C. Linington, A. Salmi und H. Wekerle.** 1993. Novel Tcr Tcra-V and -J transcripts expressed in rat myelin-specific T-cell lines. *Immunogenetics*; 37(3): 235-8
- Hoffmeyer, A.** 1994. Untersuchungen zur Zytokin-Expression von  $\gamma/\delta$ -T-Zellen der Ratte. Diplomarbeit.
- Hogquist, K. A., M. A. Gavin und M. J. Bevan.** 1993. Positive selection of CD8 T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J. Exp. Med.*; 177(5): 1469-73
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan und F. R. Carbone.** 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*; 76(1): 17-27
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson und M. J. Bevan.** 1994. The ligand for positive selection of T-lymphocytes in the thymus. *Curr. Opin. Immunol.*; 6(2): 273-8
- Hogquist, K. A., A. J. Tomlinson, W. C. Kieper, M. A. McGargill, M. C. Hart, S. Naylor und S. C. Jameson.** 1997. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity*; 6(4): 389-99
- Holman, P. O., M. E. Roth, M. Huang und D. M. Kranz.** 1993. Characterization of transcripts from unrearranged V $\alpha$ 8 genes in the thymus. *J. Immunol.*; 151(4): 1959-67
- Hong, S. C., A. Chelouche, R. H. Lin, D. Shaywitz, N. S. Braunstein, L. Glimcher und C. A. Janeway.** 1992. An MHC interaction site maps to the amino-terminal half of the T cell receptor alpha chain variable domain. *Cell*; 69(6): 999-1009
- Hori, T., X. Paliard, R. de Waal Malefijt, M. Ranes und H. Spits.** 1991. Comparative analysis of CD8 expressed on mature CD4+ CD8+ T cell clones cultured with Il-4 and that on CD8+ T cell clones: implication for functional significance of CD8 $\beta$ . *Int. Immunol.*; 3(7): 737-41
- Hu, Q., C. R. Bazemore Walker, C. Girao, J. T. Opferman, J. Sun, J. Shabanowitz, D. F. Hunt und P. D. Ashton-Rickardt.** 1997. Specific recognition of thymic self-peptides induces the positive selection of cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*; 7(2): 221-31
- Hünig, T. und M. J. Bevan.** 1980. Self H-2 antigens influence the specificity of alloreactive cells. *J. Exp. Med.*; 151(5): 1288-98



- Hünig, T.** 1985. The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. Identification and partial characterization using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*; 162(3): 890-901
- Hünig, T., H.-J. Wallny, J. K. Hartley, A. Lawetzky und G. Tiefenthaler.** 1989. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. *J. Exp. Med.*; 169(1): 73-86
- Hünig, T. and R. Mitnacht.** 1991. T-cell receptor-mediated selection of functional rat CD8 T cells from defined immature thymocyte precursors in short-term suspension culture. *J. Exp. Med.*; 173(3): 561-8
- Hugo, P., J. W. Kappler und P. C. Marrack.** 1993. Positive selection of Tcr alpha beta thymocytes: is cortical thymic epithelium an obligatory participant in the presentation of major histocompatibility complex protein? *Immunol. Rev.*; 135: 133-55
- Hunt, D. F., H. Michel, T. A. Dickinson, J. Shabanowitz, A. L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H. M. Grey und A. Sette.** 1992. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A<sup>d</sup>. *Science*; 256(5065): 1817-20
- Ignatowicz, L., J. Kappler und P. Marrack.** 1996. The repertoire of T cells shaped by a single peptide ligand. *Cell*; 84(4): 521-9
- Itohara, S., N. Nakanishi, O. Kanagawa, R. Kubo und S. Tonegawa.** 1989. Monoclonal antibodies specific to native murine T cell receptor  $\gamma/\delta$ : Analysis of  $\gamma/\delta$  T-cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 86(13): 5094-8
- Jameson, S. C., J. Kaye und N. R. J. Gascoigne.** 1990. A T cell receptor V $\alpha$  region selectively expressed in CD4+ cells. *J. Immunol.*; 145(5): 1324-31
- Jameson, S. C., P. B. Nakajima, J. L. Brooks, W. Heath, O. Kanagawa und N. R. J. Gascoigne.** 1991. The T cell receptor V $\alpha$ 11 gene family. Analysis of allelic sequence polymorphism and demonstration of J $\alpha$ -region-dependent recognition by allele-specific antibodies. *J. Immunol.*; 147(9): 3185-93
- Jameson, S. C., K. A. Hogquist und M. J. Bevan MJ.** 1994. Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature*; 369(6483): 750-2
- Jameson, S. C., K. A. Hogquist und M. J. Bevan.** 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.*; 13: 93-126
- Janeway, C. A. Jr.** 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*; 10: 645-74
- Janeway, C. A. Jr.** 1995. Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol. Tod.*; 16(5): 223-5
- Janeway, C. A. J. und K. Bottomly.** 1996. Responses of T cells to ligands for the T cell receptor. *Semin. Immunol.*; 8(2): 108-15
- Jefferies, W. A., J. R. Green und A. F. Williams.** 1985. Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.*; 162(1): 117-25
- Joly, E., A. F. Le Rolle, A. L. Gonzalez, B. Mehling, J. Stevens, W. J. Coadwell, T. Hünig, J. C. Howard und G. W. Butcher.** 1998. Co-evolution of rat TAP transporters and MHC class I RT1-A molecules. *Curr. Biol.*; 8(3): 169-72
- Johnson, P., J. Gagnon, A. N. Barclay und A. F. Williams.** 1985. Purification, chain separation and sequence of the MRC OX 8 antigen, a marker of rat cytotoxic T lymphocytes. *EMBO J.*; 4(10): 2539-45
- Johnson, P. und A. F. Williams.** 1986. Striking similarities between antigen receptor J pieces and sequence in the second chain of the murine CD8 antigen. *Nature*; 323(6083): 74-6
- Jones, E. Y.** 1997. MHC class I and class II structures. *Curr. Opin. Immunol.*; 9(1): 75-9
- Jorgensen, J. L., U. Esser, B. Fazekas de St Groth, P. A. Reay und M. M. Davis.** 1992. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature*; 355(6357): 224-30
- Jorgensen, J. L., P. A. Reay, E. W. Ehrlich und M. M. Davis.** 1992. Molecular components of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.*; 10: 835-73
- Kampinga, J., F. G. M. Kroese, G. H. Pol, P. Nieuwenhuis, F. Haag, P. B. Singh, B. Roser und R. Aspinall.** 1989. A monoclonal antibody to a determinant of the rat T cell antigen receptor expressed by a minor subset of T cells. *Int. Immunol.*; 1(3): 289-95
- Kappler, J. W., N. Roehm und P. Marrack.** 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*; 49(2): 273-80
- Kaye, J., M. L. Hsu, M. E. Sauron, S. C. Jameson, N. R. Gascoigne und S. M. Hedrick.** 1989. Selective development of CD4+ T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature*; 341(6244): 746-9

- Kern, P. S., M. K. Teng, A. Smolyar, J. H. Liu, J. Liu, R. E. Hussey, R. Spoerl, H. C. Chang, E. L. Reinherz and J. H. Wang.** Structural basis of CD8 coreceptor function revealed by crystallographic analysis of a murine CD8 $\alpha$  ectodomain fragment in complex with H-2Kb. *Immunity*; 9(4): 519-30
- Kersh, E. N., A. S. Shaw and P. M. Allen.** 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science*; 281(5376): 572-5
- Kipps, T. J.** 1989. The CD5 B cell. *Adv. Immunol.*; 47: 117-85
- Kishimoto, H and J. Sprent.** 1997. Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J. Exp. Med.* 185(2): 263-71
- Kisielow, P., H. Blüthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz und H. von Boehmer.** 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*; 333(6175): 742-6
- Kisielow, P. und A. Miazek A.** 1995. Positive selection of T cells: rescue from programmed cell death and differentiation require continual engagement of the T cell receptor. *J. Exp. Med.*; 181(6): 1975-84
- Klausner, R. D. und L. E. Samelson.** 1991. T cell antigen receptor pathways: the tyrosine connection. *Cell*; 64(5): 875-8
- Köhler, G. und C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of a predefined specificity. *Nature*; 256: 495-7
- Komori, T., A. Okada, V. Stewart und F.W. Alt.** 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of Tdt deficient lymphocytes. *Science*; 261(5125): 1171-5
- Konig, R., L. Y. Huang und R. N. Germain.** 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*; 356(6372): 796-8
- Koop, B. F., R. K. Wilson, K. Wang, B. Vernooji, D. Zaller, C. L. Kuo, D. Seto, M. Toda und L. Hood.** 1992. Organization, structure, and function of 95 kb of DNA spanning the murine T cell receptor C $\alpha$ /C $\delta$  region. *Genomics*; 13(4): 1209-30
- Koop, B. F., L. Rowen, K. Wang, C. L. Kuo, D. Seto, J. A. Lenstra, S. Howard, W. Shan, P. Deshpande und L. Hood.** 1994. The human T cell receptor TCRAC/ TCRDC (C $\alpha$ /C $\delta$ ) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics*; 19(3): 478-93
- Koop, B. F. und L. Hood.** 1994. Striking sequence similarity over almost 100 kilobases of human and mouse T-cell receptor DNA. *Nat. Genet.*; 7(1): 48-53
- Koretzky, G. A und N. J. Boerth.** 1999. The role of adapter proteins in T cell activation. *Cell. Mol. Life Sci.*; 56(11-12): 1048-60
- Kruisbeek, A. M.** 1993. Development of alpha beta T cells. *Curr. Opin. Immunol.*; 5(2): 227-34
- Kühnlein, P., J.-H. Park, T. Herrmann, A. Elbe und T. Hünig.** 1994. Identification and characterization of rat  $\gamma\delta$  T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the  $\gamma\delta$  T cell receptor. *J. Immunol.*; 153(3): 979-86
- Kuzushima, K., R. Sun, G. M. van Bleek, Z. Vegh und S. G. Nathenson.** 1995. The role of self-peptides in the allogeneic cross-reactivity of CTLs. *J. Immunol.*; 155(2): 594-601
- Lafaille, J. J., A. DeCloux, M. Bonneville, Y. Takagaki und S. Tonegawa.** 1989. Junctional sequences of T cell receptor  $\gamma\delta$  genes: implication for  $\gamma\delta$  T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell*; 59(5): 859-70
- Landau, N. R., D. G. Schatz, M. Rosa und D. Baltimore.** 1987. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector. *Mol. Cell Biol.*; 7(9): 3237-43
- Lanzavecchia, A.** 1997. Understanding the mechanism of sustained signaling and T cell activation. *J. Exp. Med.*; 185(10): 1717-9
- Lanzavecchia, A., G. Lezzi und A. Viola.** 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*; 96(1): 1-4
- Lawetzky, A., G. Tiefenthaler, R. Kubo und T. Hünig.** 1990. Identification and characterization of rat subpopulations expressing T cell receptors  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$ . *Eur. J. Immunol.*; 20(2): 343-9
- Ledbetter, J. A., R. V. Rouse, H. S. Micklem und L. A. Herzenberg.** 1980. T-cell subsets defined by expression of Lyt-1, 2, 3 and Thy-1 antigens. Two parameter immunofluorescence and cytotoxic analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J. Exp. Med.*; 152(2): 280-95
- Lee, K. W., S. H. Lee, H. J. Kin, Y. M. Choi und M. Motomura.** 1999. Experimental autoimmune myasthenia gravis and CD5+ B-lymphocyte expression. *J. Korean Med. Sci.*; 14(1): 75-9
- Leimonier, F. F., S. J. Burakoff, R. N. Germain und B. Benacerraf.** 1977. Cytolytic thymus-derived lymphocytes specific for allogeneic stimulator cells crossreact with chemically modified syngeneic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 74(3): 1229-33
- Lewis, S. M.** 1994. P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin. Immunol.*; 6(3): 131-41

- Liao**, N.-S. und D. H. Raullet. 1992. Expression of the Mls-1<sup>a</sup> superantigen results in an increased frequency of V $\beta$ 14<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.*; 149(4): 1151-5
- Lieber**, M. R. 1991. Site-specific recombination in the immune system. *FASEB J.*; 5(14): 2934-44
- Littman**, D. R. 1987. The structure of the CD8 and CD4 genes. *Ann. Rev. Immunol.*; 5: 561-84
- Lowin-Kropf**, B., V. S. Shapiro und A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosin-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell. Biol.*; 140(4): 861-71
- Luescher**, I. F., E. Vivier, A. Layer, J. Mahiou, F. Godeau, B. Malissen und P. Romero. 1995. CD8 modulation of T-cell antigen receptor-ligand interactions on living cytotoxic T lymphocytes. *Nature*; 373(6512): 353-6
- Lyons**, D. S., S. A. Lieberman, J. Hampl, J. J. Boniface, Y. Chien, L. J. Berg und M. M. Davis. 1996. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity*; 5(1): 53-61
- Macatonia**, S. E., S. C. Knight, A. J. Edwards, S. Griffiths und P. Fryer. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanat. *J. Exp. Med.*; 166(6): 1654-67
- MacDonald**, H. R., R. K. Lees, R. Schneider, R. M. Zinkernagel und H. Hengartner. 1988. Positive selection of CD4<sup>+</sup> thymocytes controlled by MHC class II gene products. *Nature*; 336(6198): 471-3
- MacDonald**, H. R., R. K. Lees, S. Baschieri, T. Herrmann und A. R. Lussow. 1993. Peripheral T cell activity to bacterial superantigens *in vivo*: the response/anergy paradox. *Immunol. Rev.*; 133: 105-17
- Madrenas**, J., L. A. Chau, J. Smith, J. A. Bluestone und R. N. Germain. 1997. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J. Exp. Med.*; 185(2): 219-29
- Madden**, D. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.*; 13: 587-622
- De Magistris**, M. T., J. Alexander, M. Coggeshall, A. Altmann, F. C. A. Gaeta, H. M. Grey und A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*; 68(4): 625-34
- Maini**, R. N. und C. P. Zybek. 1988. The significance of CD5<sup>+</sup> B-cells in rheumatic disease. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*; 76: 237-42
- Malissen**, B. und M. Malissen. 1996. Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Curr. Opin. Immunol.*; 8(3): 383-93
- Marche**, P. N. und T. J. Kindt. 1986. Two distinct T-cell receptor alpha-chain transcripts in a rabbit T-cell line: implications for allelic exclusion in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 83(7): 2190-4
- Marrack**, P. und J. Kappler. 1988. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol. Tod.*; 9(10): 308-15
- Martin**, A., A. Vicente, M. Torroba, C. Moreno, E. Jimenez und A. G. Zapata. 1996. Increased numbers of CD5<sup>+</sup> B cells in the thymus of estradiol benzoate-treated rats. *Thymus*; 24(2): 111-27
- Martin**, W. D., G. G. Hicks, S. K. Mendiratta, H. I. Leva, H. E. Ruley und L. Van Kaer. 1996. H-2M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules antigen presentation and T cell repertoire selection. *Cell*; 84(4): 543-50
- Mason**, D. W., R. J. Brideau, W. R. McMaster, H. Webb, R. A. H. White und A. F. Williams. 1980. *Monoclonal antibodies*. Plenum Publishing Corp., New York. S. 251
- Mason**, D. W., R. P. Artur, M. J. Dallmann, J. R. Green, G. P. Spickett und M. L. Thomas. 1983. Functions of rat T-lymphocyte subsets isolated by means of monoclonal antibodies. *Immunol. Rev.*; 74: 57-82
- Matiba**, B., S. M. Mariani und P. H. Krammer. 1997. The CD95 system and the death of a lymphocyte. *Semin. Immunol.*; 9(1): 59-68
- Matsui**, K., J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay und M. M. Davis. 1994. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell-responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 91(26): 12862-6
- Matsumura**, M., D. H. Fremont, P. A. Peterson und I. A. Wilson. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*; 257(5072): 927-34
- Matzinger**, P. und M. J. Bevan. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell. Immunol.*; 29(1): 1-5
- McKeithan**, T. W. 1995. Kinetic proofreading in kinetic signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 92(11): 5042-6
- van Meerwijk**, J. P. und R. N. Germain. 1993. Development of mature CD8<sup>+</sup> thymocytes: selection rather than instruction? *Science*; 261(5123): 911-5

- van Meerwijk, J. P.** und R. N. Germain. 1994. The different roles of MHC class recognition in thymocyte CD4 versus CD8 lineage commitment and positive selection. *Semin. Immunol.*; 6(4): 231-9
- van Meerwijk, J. P.**, S. Marguerat, R. K. Lees, R. N. Germain, B. J. Fowlkes und H. R. MacDonald. 1997. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.*; 185(3): 377-83
- Merkenschlager, M.**, D. Graf, M. Lovatt, U. Bommhardt, R. Zamoyska und A. G. Fisher. 1997. How many thymocytes audition for selection? *J. Exp. Med.*; 186(7): 1149-58
- Miltenyi, S.**, W. Muller, W. Weichel und A. Radbruch. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*; 11(2): 231-8
- Mishell, B. B.** und S. M. Shiigi. 1980. *Selected methods in cellular immunology*. Freeman and Company, San Francisco
- Miyazaki, T.**, P. Wolf, S. Tourne, C. Waltzinger, A. Dierich, N. Barois, H. Ploegh, C. Benoist und D. Mathis. 1996. Mice lacking H-2M complexes, enigmatic elements of the MHC class peptide loading pathway. *Cell*; 84(4): 531-41
- Moebius, U.**, G. Kober, A. L. Griscelli, T. Hercend und S. C. Meuer. 1991. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Immunol.*; 21(8): 1793-800
- Moebius, U.**, P. Pallai, S. C. Harrison und E. L. Reinherz. 1993. Delineation of an extended surface contact area on human CD4 involved in class II major histocompatibility complex binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 90(17): 8259-63
- Moffatt, M. F.**, J. A. Traherne, G. R. Abecasis und W. O. Cookson. 2000. Single nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within the TCR alpha/delta locus. *Hum. Mol. Genet.*; 9(7): 1011-9
- Monaco, J. J.** 1992. A molecular model of MHC class I-restricted antigen processing. *Immunol. Tod.*; 13(5): 173-9
- Morelle, G.** 1989. A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus*; 11(1): 7-8
- Morris, M.**, A. N. Barclay und A. F. Williams. 1988. Analysis of T-cell receptor  $\beta$  chains in rat thymus and rat Ca and Cb sequences. *Immunogenetics*; 27(3): 174-9
- Nakagawa, T.**, W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters und A. Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*; 280(5362): 450-3
- Nalefski, E. A.**, S. Kasibathla und A. Rao. 1993. Functional analysis of the antigen binding site on the T cell receptor  $\alpha$  chain. *J. Exp. Med.*; 175(6): 1553-63
- Nanda, N. K.**, K. K. Arzoo, H. M. Geysen, A. Sette und E. E. Sercarz. 1995. Recognition of multiple peptide cores by a single T cell receptor. *J. Exp. Med.*; 182(2): 531-9
- Neefjes, J. J.** und H. L. Ploegh. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Tod.*; 13(5): 179-84
- Nelson, C. A.**, S. J. Petzold und E. R. Unanue. 1994. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature*; 371(6494): 250-2
- Neumeister, E. N.**, Y. Zhu, S. Richard, C. Terhorst, A. C. Chan und A. S. Shaw. 1995. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.*; 15(6): 3171-8
- Nossal, G. J.** 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell*; 76(2): 229-39
- Ohnishi, K.** 1984. Domain structures and molecular evolution of class I and class II major histocompatibility gene complex (MHC) products deduced from amino acid and nucleotide sequence homologies. *Orig. Life*; 14(1-4): 707-15
- Osman, N.**, H. Turner, S. Lucas, K. Reif und D. A. Cantrell. 1996. The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur. J. Immunol.*; 26(5): 1063-8
- Ostrov, D. A.**, W. Shi, J. C. Schwartz, S. C. Almo und S. G. Nathenson. 2000. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science*; 290(5492): 816-9
- Padlan, E. A.** 1990. On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins*; 7(2): 112-24
- Paterson, D. J.** und A. F. Williams. An intermediate cell in thymocyte differentiation that expresses CD8 but not CD4 antigen. *J. Exp. Med.*; 166(5): 1603-8
- Pecorari, F.**, A. C. Tissot und A. J. Pluckthun. 1999. Folding, heterodimeric association and specific peptide recognition of a murine alphabeta T-cell receptor expressed in Escherichia coli. *Mol. Biol.*; 285(4): 1831-43
- Petrie, H. T.**, F. Livak, D. Burtrum und S. Mazel. 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue and T cell production. *J. Exp. Med.*; 182(1): 121-7

- Pircher, H.**, N. Rebai, M. Groettrup, C. Gregoire, D. E. Speiser, M. P. Happ, E. Palmer, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner und B. Malissen. 1992. Preferential positive selection of V alpha 2+ CD8+ T cells in mouse strains expressing both H-2k and T cell receptor V alpha a haplotypes: determination with a V $\alpha$ 2-specific monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.*; 22(2): 399-404
- Platzer, C.**, G. Richter, K. Uberla, W. Muller, H. Blocker, T. Diamantstein und T. Blankenstein. 1992. Analysis of cytokine mRNA levels in interleukin-4-transgenic mice by quantitative polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol.*; 22(5): 1179-84
- Prevost-Blondel, A.**, M. Neuenhahn, M. Rawiel und H. Pircher. 2000. Differential requirement of perforin and IFN-gamma in CD8 T cell mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen. *Eur. J. Immunol.*; 30(9): 2507-15
- Punt, J. A.**, H. Suzuki, L. G. Granger, S. O. Sharrow und A. Singer. 1996. Lineage commitment in the thymus: only the most differentiated (TCR $\beta$ hi-2hi) subset of CD4+ CD8+ thymocytes has selectively terminated CD4 or CD8 synthesis. *J. Exp. Med.*; 184(6): 2091-9
- Rabinowitz, J. D.**, C. Beeson, D. S. Lyons, M. M. Davis und H. M. McConnell. 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 93(4): 1401-5
- Rammensee, H. G.**, K. Falk und O. Rotzschke. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.*; 11: 213-44
- Reich, Z.**, J. J. Boniface und D. S. Lyons. 1997. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature*; 387(6633): 617-20
- Reinherz, E. L.**, P. C. Kung, G. Goldstein, R. H. Levey und S. F. Schlossman. 1980. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 77(3): 1588-92
- Reinherz, E. L.**, K. Tan, L. Tang, P. Kern, J. Liu, Y. Xiong, R. E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Chang, G. Wagner und J. Wang. 1999. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science*; 286(5446): 1913-21
- Reth, M.** 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*; 338(6214): 383-4
- Reynolds, C. W.**, S. O. Sharrow, J. R. Ortaldo und R. B. Herberman. 1981. Natural killer activity in the rat. II. Analysis on surface antigens on LGL by flow cytometry. *J. Immunol.*; 127(6): 2204-8
- Rocha, B.**, P. Vassalli und D. Guy-Grand. 1991. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta+ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J. Exp. Med.*; 173(2): 483-6
- Rock, E. P.**, P. R. Sibbald, M. M. Davis und Y.-H. Chien. 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J. Exp. Med.*; 179(1): 323-8
- Rodewald, H. R.**, U. H. Koszinowski, K. Eichmann und I. Melchers. 1989. Predominant utilization of V $\beta$ 8+ T cell receptor genes in the H-2L<sup>d</sup>-restricted cytotoxic T cell response against the immediate early protein pp89 of the murine cytomegalovirus. *J. Immunol.*; 143(12): 4238-43
- Romeo, C.**, M. Amiot und B. Seed. 1992. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell*; 68(5): 889-97
- Roth, M. E.**, P. O. Holman und D. M. Kranz. 1991. Nonrandom use of J $\alpha$  gene segments. Influence of V $\alpha$  and J $\alpha$  gene location. *J. Immunol.*; 147(12): 1075-81
- Rötzschke, O.**, K. Falk, S. Faath und H.-G. Rammensee. 1991. On the nature of T cells involved in T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.*; 174(5): 1059-71
- Rozdzial, M. M.**, B. Malissen und T. H. Finkel. 1995. Tyrosine-phosphorylated T cell receptor  $\zeta$  chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity*; 3(5): 623-633
- Sachs, L.** *Angewandte Statistik*. 1996. 8. Auflage. Springer-Verlag. S. 426-31
- Saedler, H.** und P. Nevers. 1985. Transposition in plants: a molecular model. *EMBO J.*; 4(3): 585-90
- Salter, R. D.**, R. J. Benjamin, P. K. Wesley, S. E. Buxton, T. P. Garrett, C. Clayberger, A. M. Krensky, A. M. Norment, D. R. Littman und P. Parham. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature*; 345(6270): 41-6
- Sambrook, J.**, E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 1: 5.68
- Samelson, L. E.**, M. D. Patel, A. M. Weissman, J. B. Harford und 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(7): 1083-90
- Sanger, F.**, S. Nicklen und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 74(12): 5463-7
- Sant'Angelo, D. B.**, G. Waterbury, P. Preston-Hurlburt, S. T. Yoon, R. Medzhitov, S.-C. Hong und C. A. J. Janeway. 1996. The specificity and orientation of a TCR to its peptide-MHC class II ligands. *Immunity*; 4(4): 367-76

- Sant'Angelo**, D. B., P. G. Waterbury, B. E. Cohen, W. D. Martin, L. Van Kaer, A. C. Hayday und C. A. Janeway Jr. 1997. The imprint of intrathymic self-peptides on the mature T cell receptor repertoire. *Immunity*; 7(4): 517-24
- Schneider**, R., R. K. Lees, T. Pedrazzini, R. M. Zinkernagel, H. Hengartner und H. R. MacDonald. 1989. Postnatal disappearance of self-reactive (V $\beta$ 6+) cells from the thymus of Mls<sup>a</sup> mice. *J. Exp. Med.*; 169(6): 2149-58
- Schodin**, B. A., T. J. Tsomides und D. M. Kranz. 1996. Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity. *Immunity*; 5(2): 137-46
- Schreiber**, E., P. Matthias, M. M. Müller und W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with „mini-extracts“ prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*; 17(15): 6419
- Schuhmacher**, T. N. und H. L. Ploegh. 1994. Are MHC-bound peptides a nuisance for positive selection? *Immunity*; 1(3): 721-3
- Scollay**, R. und D. I. Godfrey. 1995. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol. Tod.*; 16(6): 268-74
- Sebzda**, E., V. A. Wallace, J. Mayer, R. S. Yeung, T. W. Mak und P. S. Ohashi. 1994. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science*; 263(5153): 1615-8
- Shaw**, A. S. und M. L. Dustin. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*; 6(4): 361-9
- Sherman**, L. A. und S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.*; 11: 385-402
- Shirwan**, H., M. Ohanjanian, G. Burcham, L. Makowka und D. V. Cramer. 1993. Structure and diversity of rat T cell receptor  $\alpha$ -chain genes. *J. Immunol.*; 150(6): 2295-304
- Shirwan**, H., L. Barwari, I. Fuss, L. Makowka und D. V. Cramer. 1995. Structure and repertoire usage of rat TCR  $\alpha$ -chain genes in T cells infiltrating heart allografts. *J. Immunol.*; 154(4): 1964-72
- Shiue**, L., S. D. Gorman und J. R. Parnes. 1988. A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 168(6): 1993-2005
- Shortman**, K., M. Egerton, G. J. Spangrude und R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.*; 2(1): 3-12
- Shortman**, K., D. Vremec und M. Egerton. 1991. The kinetics of the T cell antigen expression by subgroups of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes: delineation of CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>3(2<sup>+</sup>) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J. Exp. Med.*; 173(2): 323-32
- Sim**, B. C., L. Zerva, M. I. Greene und N. R. J. Gascoigne. 1996. Control of MHC restriction by TCR V $\alpha$  CDR1 and CDR2. *Science*; 273(5277): 963-6
- Sim**, B. C., D. Lo und N. R. Gascoigne. 1998. Preferential expression of TCR V alpha regions in CD4/CD8 subsets: class discrimination or co-receptor recognition? *Immunol. Tod.*; 19(6): 276-82
- Sim**, B. C., N. Aftahi, C. Reilly, B. Bogen, R. H. Schwartz, N. R. Gascoigne und D. Lo. 1998. Thymic skewing of the CD4/CD8 ratio maps with the T-cell receptor alpha-chain locus. *Curr. Biol.*; 8(12): 701-4
- Sim**, B. C. und N. R. Gascoigne. 1999. Reciprocal expression in CD4 or CD8 subsets of different members of the V alpha 11 gene family correlates with sequence polymorphism. *J. Immunol.*; 162(6): 3153-9
- Simons**, K. und E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*; 387(6633): 569-72
- Simonson**, M. 1967. The clonal selection hypothesis evaluated by grafting cells reacting against their hosts. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 32: 517-9
- Smaby**, J. M., M. Momsen, V. S. Kulkarni und R. E. Brown. 1996. Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry*; 35(18): 5696-704
- Smith**, C. A., G. T. Williams, R. Kingston, E. J. Jenkinson und J. J. T. Owen. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*; 337(6203): 181-4
- Smith**, L. R., D. H. Kono und A. N. Theofilopoulos. 1991. Complexity and sequence identification of 24 rat V $\beta$  genes. *J. Immunol.*; 147(1): 375-9
- Sprent**, J., D. Lo, E. K. Gao und Y. Ron. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.*; 101: 173-90
- Stern**, L. J. und D. C. Wiley. 1994. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure*; 2(4): 245-51
- Stern**, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger und D. C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*; 368(6468): 215-21

- Stienekemeier, M., K. Hofmann, R. Gold und T. Herrmann.** 2000. A polymorphism of the rat T-cell receptor beta-chain variable gene 13 (BV13S1) correlates with the frequency of BV13S1-positive CD4 cells. *Immunogenetics*; 51(4-5): 296-305
- Sun, J., D. J. Leahy und P. B. Kavathas.** 1995. Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J. Exp. Med.*; 182(5): 1275-80
- Sussman, J. J., J. S. Bonifacio, J. Lippincott-Schwartz, A. M. Weissman, T. Saito, R. D. Klausner und J. D. Ashwell.** 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell*; 52(1): 85-95
- Swat, W., L. Ignatowicz, H. von Boehmer und P. Kisielow.** 1991. Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature*; 351(6322): 150-3
- Swat, W., M. Dessing, A. Baron, P. Kisielow und H. von Boehmer.** 1992. Phenotypic changes accompanying positive selection of CD4+CD8+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.*; 22(9): 2367-72
- Swat, W., M. Dessing, H. von Boehmer und P. Kisielow.** 1993. CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur. J. Immunol.*; 23(3): 739-46
- Sykulev, Y., A. Brunmark, M. Jackson, R. J. Cohen, P. A. Peterson und H. N. Eisen.** 1994. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. *Immunity*; 1(1): 15-22
- Sykulev, Y., M. Jooh, I. Vturina, T. J. Tsomides und H. N. Eisen.** 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*; 4(6): 565-71
- Teh, H. S., P. Kisielow und B. Scott.** 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*; 335(6187): 229-33
- Teng, M. K., A. Smolyar, A. G. Tse, J. H. Liu, J. Liu, R. E. Hussey, S. G. Nathenson, H. C. Chang, E. L. Reinherz und J. H. Wang.** 1998. Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes. *Curr. Biol.*; 8(7): 409-12
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*; 22: 4673
- Tomonari, K.** 1992. Positive selection of V $\beta$ 2+ CD8+ T cells. *Int. Immunol.*; 4(10): 1195-8
- Tomonari, K.** 1992. Negative selection of Tcr $\alpha$ -V8+ CD8+ T cells by MHC class I molecules. *Immunogenetics*; 35(5): 291-5
- Tomonari, K., S. Fairchild und O. A. Rosenwasser.** 1993. Influence of viral superantigens on V $\beta$ - and V $\alpha$ -specific positive and negative selection. *Immunol. Rev.*; 131: 131-68
- Torres-Nagel, N., E. Kraus, M. H. Brown, G. Tiefenthaler, R. Mitnacht, A. F. Williams und T. Hünig.** 1992. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur. J. Immunol.*; 22(11): 2841-8
- Torres-Nagel, N. E., D. P. Gold und T. Hünig.** 1993. Identification of rat Tcr $\beta$ -V8.2, 8.5, and 10 gene products by monoclonal antibodies. *Immunogenetics*; 37(4): 305-8
- Torres-Nagel, N., G. Giegerich, D. P. Gold und T. Hünig.** 1994. Identification of rat Tcr $\alpha$  V 4 and 8 gene products by monoclonal antibodies and cDNA sequence. *Immunogenetics*; 39(5): 367-70
- Torres-Nagel, N., T. Herrmann, G. Giegerich, K. Wonigeit und T. Hünig.** 1994. Preferential TCR V usage in positive repertoire selection and alloreactivity of rat T-lymphocytes. *Int. Immunol.*; 6(9): 1367-73
- Torres-Nagel, N. E.** 1994. On the role of T-cell antigen receptor variable segments in the selection of the rat  $\alpha\beta$  T-cell receptor. Doktorarbeit.
- Torres-Nagel, N., A. Deutschländer, T. Herrmann, B. Arden und T. Hünig.** 1997. Control of TCR V $\alpha$ -mediated positive repertoire selection and alloreactivity by differential J $\alpha$  usage and CDR3 $\alpha$  composition. *Int. Immunol.*; 9(10): 1441-52
- Torres-Nagel, N. E., T. Herrmann und T. Hünig.** 1998. The rat T cell receptor. *Handbook of Vertebrate Immunology*. P. P. Pastoret, H. Bazin, P. Griebel und A. Govaerts (editors). F. G. M. Kroese Academic press, New York. S. 162
- Torres-Nagel, N., B. Mehling, A.-F. LeRolle, E. Joly und T. Hünig.** 2001. Genetic control of peripheral TCRAV usage by representation in the preselection repertoire and MHC allele-specific overselection. *Int. Immunol.*; 13(1): 63-73
- Townsend, R. R., J. Rothbard, F. M. Gotch, G. Bahadur, D. Wraith und A. J. McMichael.** 1986. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*; 44(6): 959-68
- Trinchieri, G., D. Peritt und F. Gerosa.** 1996. Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.*; 7(2): 123-32

- Uberla, K., C. Platzer, T. Diamantstein und T. Blankenstein.** 1991. Generation of competitor DNA fragments for quantitative PCR. *PCR Methods Appl.*; 1(2): 136-9
- Udaka, K., T. J. Tsomides und H. N. Eisen.** 1992. A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in association with a class I MHC proteine. *Cell*; 69(6): 989-98
- Ullman, K. S., J. P. Northrop, C. L. Verweij und G. R. Grabtree.** 1990. Transmission of signals from T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu. Rev. Immunol.*; 8: 421-52
- Utsunomiya, Y., J. Bill, E. Palmer, K. Gollob, Y. Takagaki und O. Kanagawa.** 1989. Analysis of a monoclonal rat antibody directed to the  $\alpha$  chain variable region (V $\alpha$ 3) of the mouse T cell antigen receptor. *J. Immunol.*; 143(8): 2602-8
- Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan und A. Lanzavecchia.** 1995. Serial triggering of many T cell receptors by a few peptide MHC complexes. *Nature*; 375(6527): 148-51
- Valitutti, S., M. Dessing, K. Aktories, H. Gallati und A. Lanzavecchia.** 1995. Sustained signaling leading to T cell activation derives from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.*; 181(2): 577-84
- Valitutti, S., S. Mueller, M. Dessing und A. Lanzavecchia.** 1996. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.*; 183(4): 1917-21
- Vanhecke, D., B. Verhasselt, M. De Smedt, B. De Paepe, G. Leclercq, J. Plum und B. Vandekerckhove.** 1997. MHC class II molecules are required for initiation of positive selection but not during terminal differentiation of human CD4 single positive thymocytes. *J. Immunol.*; 158(8): 3730-7
- Vanhecke, D., B. Verhasselt, M. De Smedt, G. Leclercq, J. Plum und B. Vandekerckhove.** 1997. Human thymocytes become lineage committed at an early postselection CD69+ stage, before the onset of functional maturation. *J. Immunol.*; 159(12): 5973-83
- Vermeer, L. A., N. K. de Boer, C. Bucci, N.A. Bos, F. G. Kroese und S. Alberti.** 1994. MRC OX19 recognizes the rat CD5 surface glycoprotein, but does not provide evidence for a population of CD5bright B cells. *Eur. J. Immunol.*; 24(3): 585-92
- Viola, A. und A. Lanzavecchia.** 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*; 273(5271): 104-6
- Viola, A., M. Salio, L. Tuosto, S. Linkert, A. Acuto und A. Lanzavecchia.** 1997. Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. *J. Exp. Med.*; 186(10): 1775-9
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara und A. Lanzavecchia.** 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganisation of membrane microdomains. *Science*; 283(5402): 680-2
- Vooijs, W. C., M. G. Nootebos, H. Wernert und G. C. de Gast.** 1995. Specific interferon-gamma producing CD4+ and CD8+ T cells after autologous EBV-B stimulation: the necessity of restimulation. *Scand. J. Immunol.*; 42(6): 591-7
- Wei, S. und P. Concannon.** 1996. Repertoire and organization of human T-cell receptor alpha region variable genes. *Genomics*; 38(3): 442-5
- Weiss, A. und D. Littman.** 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*; 76(2): 263-74
- Whitman, M. C., J. Strohmeier, K. O'Boyle, J. M. Tingem, Y. Wilkinson, J. Goldstein, T. Chen, K. Brorson, M. Brunswick, und S. Kozlowski.** 2000. The isolated major histocompatibility complex class I alpha 3 domain binds beta2m and CD8alphaalpha dimers. *Mol. Immunol.*; 37(3-4): 141-9
- Wilkinson, R. W., G. Anderson, J. J. T. Owen und E. J. Jenkinson.** 1995. Positive selection of thymocytes involves sustained interactions with the thymic microenvironment. *J. Immunol.*; 155(11): 5234-40
- Williams, C. B., E. P. Blankenhorn, K. E. Byrd, G. Levinson und G. A. Gutman.** 1991. Organization and nucleotide sequence of the rat T cell receptor  $\alpha$  chain complex. *J. Immunol.*; 146(12): 4406-13
- Yamaguchi, T. und W. A. Hendrickson.** 1996. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature*; 384(6608): 484-9
- Ysern, X., H. Li und R. A. Mariuzza.** Imperfect interfaces. *Nat. Struct. Biol.*; 5(6): 412-4
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble und L. E. Samelson.** 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*; 92(1): 83-92
- Zinkernagel, R. M. und P. C. Doherty.** 1974. Restriction of *in vitro* T cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*; 248(5475): 701-2
- Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, A. Althage, S. Cooper, P. A. Klein und J. Klein.** 1978. On the thymus in the differentiation of „H-2 self-recognition“ by T cells: evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.*; 147(3): 882-96



## 8 ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin
Å	Angstrom
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Mikroglobulin
bio	Biotin
BN	Brown-Norway (Rattenstamm)
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
BSS	balanced salt solution
BUF	Buffalo rat (Rattenstamm)
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CDR	complementarity determining region
cfu	koloniebildende Einheit
CPK	Corey Pauling Koltun
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen
D-Region	Region der schweren Ig-Kette („diversity“)
D $\alpha$ MIg	Esel(donkey)-anti-Maus(mouse)-Immunglobulin
DC	dendritische Zellen (dendritic cells)
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat (Stop-Nukleotid)
DIG	detergent insoluble glycolipid complex
2D Kd	zweidimensionale Affinität
DN	doppelt negative (CD4- und CD8-) Zellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

DP	doppelt positive (CD4+ und CD8+) Zellen
DTT	Dithiothreitol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FACS	fluorescence-activated cell sorter (Fluoreszenzsorter)
FACScan	fluorescence-activated cell scanner (Fluoreszenzscanner)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
FTOC	fetal thymic organ culture
G	Guanosin
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
HTLV	human T-cell lymphotropic virus
HV4	hypervariable region 4
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
J-Region	Region der schweren Ig-Kette („joining“)
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
Kd	Dissoziationskonstante (Einheit: M)
KF	Kontrollfragment
LAT	linker for activation of T cells
LB	Luria-Bertani
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus
LEW	Lewis (Rattenstamm)
LFA	lymphocyte-function-associated-antigen
LK	Lymphknoten
LP	lower PCR-Primer

M	molar ( $1M = 6,022045 \times 10^{23}$ Teilchen/l)
MACS	magnetic activated cell sorter (Magnetzellsorter)
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	multiple cloning site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction)
mRNA	messenger RNA
N	normal
NK	natürliche Killerzellen
NMIg	normales Mausimmunglobulin
OD	optische Dichte
p	Plasmid
PBS	phosphate buffered saline
PCD	programmed cell death
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pMHC	MHC-Peptid-Komplex
PTK	Protein Tyrosinkinase
PVG	Piebald Virol Glaxo (Rattenstamm)
rad	Einheit der Energiedosis $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Joule/kg} = 10^{-2} \text{ Gray}$
R $\alpha$ MIg	Kaninchen(rabbit)-anti-Maus(mouse)-Immunglobulin
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAsin	Ribonuklease-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
S.	Seite
SA	Streptavidin

SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SP	einzel (single) positive (CD4+ oder CD8+) Zellen
SSC	side scatter
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TCR $\alpha$	$\alpha$ -Kette des T-Zellrezeptors
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
(c-)TEC	(cortical) thymic epithelial cells
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Tyr	Tyrosin
U	Einheiten (units)
UP	upper PCR-Primer
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V-Region	Region der schweren Ig-Kette („variable“)
Vol	Volumen
W	Watt
WF	Wistar-Furth (Rattenstamm)

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Thomas Hünig für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Sehr danke ich Herrn Professor Dr. med. Ralf Gold für die Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Dankbar bin ich Frau Dr. rer. nat. Nora Torres-Nagel für die ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit, für die stetige Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Weiterhin gilt mein Dank Anne Asmuß, Astrid Bischof, Thomas Hanke, Thomas Herrmann, Kathrin Hoffmann, Uwe Kretschmer, Petra Kühnlein, Rita Mitnacht, Michael Tacke, Frank Straube und Martina Wolf für viele Ratschläge und eine sehr gute Zusammenarbeit.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern und meinen Freunden.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Angela Deutschländer  
geboren am 30.01.1973 in München  
ledig

## Schulbildung

1979 – 1992  
05/1992  
Grundschule, Gymnasium in Hofheim  
Abitur

## Studium

11/1992 – 11/1999  
Medizinstudium an der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
09/1994  
Physikum  
08/1996  
1. Staatsexamen  
09/1998  
2. Staatsexamen  
1998/99  
Praktisches Jahr  
Chirurgie: University of Stellenbosch, Südafrika  
Infektiologie: North Western University, Chicago, IL  
Kardiologie: University of Edinburgh, UK  
Neurologie: Universität Würzburg  
11/1999  
3. Staatsexamen

## Famulaturen

Innere Medizin  
Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika;  
Glen Cowie Hospital, Lebowa, Südafrika;  
Kreiskrankenhaus Tauberbischofsheim  
Chirurgie  
Victoria Hospital, Mahé, Seychellen;  
Holland Hottentot Hospital, Somerset West, Südafrika  
Neurologie  
Technische Universität, München  
Radiologie  
Allgemeines Krankenhaus, Wien  
Rechtsmedizin  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Pharmazeutische Industrie  
Hoechst Marion Roussel, Sydney, Australien;  
Hoechst AG, Milton Keynes, Großbritannien

## Ärztliche Weiterbildung

02/00 – 07/01  
Ärztin im Praktikum, Neurologische Klinik, Klinikum  
Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München  
08/01  
Approbation als Ärztin  
seit 08/01  
Assistenzärztin, Neurologische Klinik, Klinikum  
Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Würzburg, 15.11.2001

*A. Deutschländer*