

Aus dem Bereich Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie,
Klinische Immunologie und Rheumatologie
des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung des Bindungsmodus einer neuen Art von
Antikörpern, welche in Analogie eines T-Zell-Rezeptors an den
IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex binden**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von: Natascha Karina Maria Morsch
geb. am: 05.11.1989 in Neunkirchen (Saar)

Tag der Promotion: 19.01.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Gerhard Held

Prof. Norbert Graf

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Einleitung	5
1 Das Immunsystem allgemein	5
2 Das adaptive Immunsystem	5
2.1 Antigene.....	5
2.2 Antigenerkennung durch Lymphozyten	6
2.2.1 B-Lymphozyten.....	6
2.2.1.1 Entwicklung der B-Lymphozyten	7
2.2.1.2 Struktur von Antikörpern und BCR.....	7
2.2.1.3 Funktion von Antikörpern	10
2.2.1.4 Erzeugung der Antikörpervielfalt und Klassenwechsel	11
2.2.2 T-Lymphozyten.....	14
2.2.2.1 Entwicklung der T-Lymphozyten.....	16
2.2.2.2 Der T-Zell-Rezeptor	16
2.3 MHC-Moleküle als Instrument der Antigenpräsentation	18
2.3.1 MHC II	19
2.3.1.1 Antigenbeladung der HLA Klasse II-Moleküle	19
2.3.1.2 Aufbau der HLA Klasse II-Moleküle	20
2.3.2 MHC I	20
2.3.2.1 Antigenbeladung der HLA Klasse I-Moleküle.....	20
2.3.2.2 Aufbau der HLA Klasse I-Moleküle	21
2.4 Interaktion zwischen TCR und pMHC-Komplex.....	22
3 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit	24
Material und Methoden	26

1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	26
2	Peptide, Antikörper und Färbereagenzien.....	29
3	Sonstiges	38
4	Geräte und Software	39
5	Puffer und Lösungen.....	40
6	Herstellung löslicher MHC-Peptid-Komplexe.....	44
6.1	Transformation und Induktion der Bakterien, In-vivo-Biotinylierung und Expression der löslichen schweren und leichten Kette.....	44
6.2	Aufreinigung der inclusion bodies	45
6.3	Gel Shift Assay	47
6.4	Faltung der MHC-Peptid-Komplexe	47
7	Konzentrationsbestimmung und Aliquotieren der pMHC-Komplexe	49
8	Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE	49
9	UV-mediated ligand exchange.....	50
10	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	51
10.1	Quantifizierung der Bindung der Serumantikörper an den mutierten MHC-Peptid-Komplexen.....	51
10.2	Kontroll-ELISA	53
	Ergebnisse	54
1	Herstellung der mutierten HLA-A*0201-IMP-Komplexe.....	54
1.1	Kontrolle In-vivo-Biotinylierung mittels Gel Shift Assay	55
1.2	Faltung und Reinigung	56
1.3	Kontrolle der richtigen Faltung	57
2	Serumcharakterisierung	59
3	Bindungsmodus der Serumantikörper.....	63
	Diskussion	72
1	Herkunft der verwendeten Seren - Eine neue Kategorie der Antikörper.....	72
2	Methoden	73

2.1	UV-mediated ligand exchange	73
2.2	Herstellen der mutierten Komplexe und Lokalisation der Bindungsstellen.....	74
3	Ergebnisse	74
3.1	Bindungsmodus ähnlich dem des TCR	74
3.2	Neuer Bindungsmodus	76
4	Mögliche Funktion der charakterisierten Antikörper	78
5	Ausblick	79
6	Zusammenfassung und Kritik	79
	Appendix	81
1	Abbildungsverzeichnis.....	81
2	Tabellenverzeichnis	82
3	Literaturverzeichnis	83
4	Danksagung.....	93
5	Lebenslauf.....	94

Zusammenfassung

Im adaptiven Immunsystem wird eine zelluläre von einer humoralen Immunantwort unterschieden. Während Antikörper auch unprozessierte Antigene erkennen können, sind zytotoxische CD8⁺-Zellen auf die Präsentation von Antigenen im MHC-I-Komplex angewiesen, was man als MHC-Restriktion der T-Zellen bezeichnet. Die T-Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, welcher die pMHC-Komplexe in einer bisher gut untersuchten Art und Weise bindet und eine Immunantwort in Gang setzt.

Neu ist nun, dass in Seren freiwilliger Spender IgG-Antikörper gefunden werden konnten, welche in Analogie eines T-Zell-Rezeptors an die pMHC-Komplexe binden.

Mit Hilfe des UV-mediated ligand exchange konnte die Spezifität der Serumantikörper näher bestimmt werden. Es wurden Antikörper gefunden welche ausschließlich das IMP₅₈₋₆₆-Peptid präsentiert im HLA-A*0201-Komplex erkannten und eine Gruppe von Antikörpern herausgearbeitet, welche eine distinkte Kreuzreaktivität aufwiesen.

Durch gezieltes Einbringen von Mutationen in die schwere Kette des MHC-Komplexes konnte der Bindungsmodus beider Gruppen von Serumantikörpern im Sinne eines Fußabdrucks näher charakterisiert werden.

Es ergaben sich zwei verschiedene Bindungsmodi. Die IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex spezifischen Antikörper zeigten einen Bindungsmodus, welcher im Wesentlichen mit dem des T-Zell-Rezeptors vergleichbar ist. Die distinkt kreuzreaktiven Antikörper hingegen zeigten eine Bindung seitlich am IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex im Bereich des n-terminalen Endes des Peptides.

Der Nachweis, dass Antikörper ebenso endogene Antigene prozessiert und präsentiert im MHC-Komplex erkennen können, eröffnet eine ganz neue Sichtweise auf das adaptive Immunsystem und neue Perspektiven der Interaktion zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem.

Summary

The adaptive immune system distinguishes between cellular and humoral immune responses. While antibodies can also recognise unprocessed antigens, cytotoxic CD8⁺ cells depend on the presentation of antigens in the MHC-I complex, which is known as the MHC restriction of T cells. The T-cells have a T-cell receptor on their cell surface which binds the pMCH complexes in a previously well studied way and initiates an immune response.

What is new about it now is that IgG antibodies have been found in sera of voluntary donors that bind to the pMHC complexes by analogy with a T cell receptor.

With the help of UV-mediated ligand exchange the specificity of the serum antibodies could be determined. Antibodies were found which exclusively recognized the IMP₅₈₋₆₆ peptide presented in the HLA-A*0201 complex and we identified a group of antibodies which exhibited distinct cross-reactivity.

By introducing mutations into the heavy chain of the MHC complex, the binding mode of both groups of serum antibodies could be characterized more closely.

There were two different binding modes. The IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201 complex specific antibodies showed a binding mode that is essentially comparable to that of the T cell receptor. The distinct cross-reactive antibodies, on the other hand, showed a more lateral binding at the IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201 complex at the n-terminal end of the peptide.

The observation that antibodies can also recognize endogenous antigens presented in the MHC complex opens whole new perspectives on the adaptive immune system and on the interaction between humoral and cellular immune responses.

Abkürzungsverzeichnis

A	ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
	AID	activation-induced desaminase
	APZ	antigenpräsentierende Zellen
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BCR	B cell receptor
	BSP	BirA-Substrat-Peptid
C	CD	cluster of differentiation
	CDR	complementary determining regions
	CMV	Cytomegalievirus
	CSR	class switch recombination
	CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
D	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	deoxyribonucleic acid
E	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Fab	fragment antigen binding
	Fc	fragment cristallisable
	FPLC	fast protein liquid chromatography
	FR	framework region
G	GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H	HLA	humanes Leukozytenantigen
	HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
I	Ig	Immunglobulin
	IL	Interleukin
	IMP	influenza matrix protein
	INF	Interferon
	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
	ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif

Abkürzungsverzeichnis

L	LB	lysogeny broth
M	mAb	monoclonal antibody
	MHC	major histocompatibility complex
	MIP	macrophage inflammatory protein
N	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
O	OD	optische Dichte
P	PBS	phosphate buffered saline
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	RAG	recombination activating gene
	RSS	recombination signal sequence
	RT	Raumtemperatur
S	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
T	TAP	transporter associated with antigen processing
	TCR	T cell receptor
	TNF	Tumor Nekrose Faktor
W	WT	Wildtyp

Einleitung

1 Das Immunsystem allgemein

Das Immunsystem stellt ein komplexes System aus Zellen und Faktoren dar, welche den Körper befähigen sich gegen Erreger und Fremdstoffe zu wehren. Zudem ist es ein Abwehrmechanismus gegen körpereigene entartete Stoffe bzw. Zellen.

Das Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Man unterscheidet eine angeborene von einer erworbenen (adaptiven) Abwehr.

Die angeborene Immunität ist unspezifisch. Zu ihr zählt man die mechanischen Barrieren, die Krankheitserreger auf ihrem Weg in den Körper durchdringen müssen, wie z.B. die Haut mit ihrem Säureschutzmantel und die Schleimhäute bedeckt mit Speichel oder Tränenflüssigkeit. Wichtige zelluläre Bestandteile sind Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen. Die Kommunikation zwischen diesen Zellen erfolgt über Chemokine, proinflammatorische Cytokine, Eikosanoide, Prostaglandine, Prostazykline und Toll-like Rezeptoren.

Die adaptive Immunität entwickelt sich erst mit der Zeit durch Kontakte des Immunsystems mit verschiedenen Umweltantigenen. Sie kommt zum Einsatz, wenn die angeborene Abwehr mit einer Infektion nicht alleine fertig wird. Wichtige Eigenschaften der erworbenen Abwehr sind die Spezifität, die Fähigkeit ein Gedächtnis auszubilden, die Fremderkennung und die Selbsttoleranz. Letztere spielt eine große Rolle bei Autoimmunkrankheiten und ermöglicht die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdartigenen (Goodnow et al., 2005).

Auch die adaptive Immunität besteht aus zellvermittelten und humoralen Abwehrmechanismen. Als Effektorzellen der zellvermittelten Abwehr dienen die T-Lymphozyten. Man unterscheidet hier zwischen T-Killer-, T-Gedächtnis- und T-Helferzellen. Die humorale Abwehr wird durch Antikörper vermittelt, an deren Bildung B-Lymphozyten beteiligt sind.

2 Das adaptive Immunsystem

2.1 Antigene

Antigene können körperfremde oder auch körpereigene Stoffe darstellen, die zu einer Immunantwort führen. Es handelt sich um Substanzen, die von Rezeptoren auf Immunzellen erkannt werden.

Meistens sind Antigene Proteine, können aber auch Kohlenhydrate oder Lipide sein.

Nicht-Protein-Antigene werden auch als Thymus-unabhängige Antigene bezeichnet, da sie nicht in der Lage sind eine T-Zell-Antwort hervorzurufen, sondern über ihre repetitiven Sequenzen BCR

quervernetzen und so eine Immunreaktion veranlassen. Thymus-abhängige Antigene sind Proteine und werden von APZ in MCH-Molekülen an die T-Lymphozyten präsentiert und beziehen diese so in die Immunantwort mit ein. (Defrance et al., 2011)

Der Teil eines Antigens, der von den Zellen oder Antikörpern erkannt wird, bezeichnet man als Epitop oder antigene Determinante. Man unterscheidet diskontinuierliche von kontinuierlichen Epitopen. T-Zellen erkennen Antigene nur in ihrer entfalteten Form, dem kontinuierlichen linearen Epitop, präsentiert in einem MHC-Komplex (Clevers et al, 1988). Antikörper können diskontinuierliche Epitope erkennen, diese bestehen aus einer Nebeneinanderreihung von Aminosäuren, die durch die Tertiärstruktur des Proteins bedingt ist.

2.2 Antigenerkennung durch Lymphozyten

2.2.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind die Effektorzellen der humoralen Immunantwort. Sie tragen membrangebundene Antikörper auf ihrer Zelloberfläche (Pernis et al., 1970), welche als BCR fungieren (Pernis et al., 1971). Da der BCR, genau wie lösliche Immunglobuline, Antigene in ihrer Tertiärstruktur in Lösung oder auf Zelloberflächen erkennt, ist er an der Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger beteiligt. Sogar sehr kleine Mengen des passenden Antigens werden wahrgenommen (Patel und Neuberger, 1993).

B-Lymphozyten fungieren als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten, so führt die Aktivierung des BCR zur Endozytose des Antigens (Patel und Neuberger, 1993). Dieses wird dann prozessiert, an MHC-II-Moleküle (major histocompatibility complex) gebunden und an die Zelloberfläche gebracht. Der pMHC-Komplex wird von CD4⁺-T-Zellen erkannt, was zu einer B-Zell-Proliferation und einer Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen führt. Für die Aktivierung der B-Zelle sind mehrere Signale, meist ausgehend von einer T_H2-Zelle, notwendig. Zum einen schüttet die T-Helferzelle, die den pMHC-Komplex erkannt hat, Zytokine, vor allem IL4, aus und zum anderen exprimiert sie nach Kontakt einen CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche, mit dessen Hilfe sie CD40 auf B-Zellen aktiviert (Banchereau et al., 1991). Die ruhende Zelle kann nun in den Zellzyklus eintreten und proliferieren.

Wie bereits erwähnt, gibt es auch Thymus-unabhängige Antigene, z.B. Polysaccharide, die durch ihre wiederkehrenden Sequenzen BCR quervernetzen und so zu einer B-Zell-Aktivierung ohne T-Zell-Hilfe führen. In diesem Fall kommt es jedoch nur zu einer Differenzierung zu sehr kurzlebigen Plasmazellen mit eingeschränktem Isotypen-Wechsel (Schroeder und Cavacini, 2010).

2.2.1.1 Entwicklung der B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen. Alle B-Zellen besitzen CD19 als charakteristisches Oberflächenprotein. Sie durchlaufen verschiedene Stadien der Reifung, die sich durch die Expression von weiteren unterschiedlichen Oberflächenmolekülen einteilen lassen. Zusätzlich beginnen die Vorläuferzellen in verschiedenen Stadien mit dem Rearrangement der Gene für den BCR (Osmond et al., 1998).

Man unterscheidet sechs verschiedene Stadien, wobei die frühen Vorläuferzellen abhängig sind von engem Kontakt zu Stromazellen des Knochenmarks und IL7, welches von diesen gebildet wird (Hardy et al., 1991).

Am Anfang der Reifung steht die frühe Pro-B-Zelle, die noch keine Teile des BCR exprimiert, jedoch schon mit der D-J-Umordnung für die schwere Kette begonnen hat. Im weiteren Verlauf entwickelt sich daraus eine späte Pro-B-Zelle, in der das V_H -Gensegment an DJ_H angeknüpft wird. Es wird nun eine intakte μ -Kette (schwere Kette eines IgM) gebildet und mit einer vorläufigen leichten Kette als Prä-BCR an die Oberfläche gebracht (Li et al., 1993). In diesem Stadium werden die Zellen als große Prä-B-Zellen bezeichnet. Die kleinen Prä-B-Zellen entstehen durch Zellteilung aus den großen Prä-B-Zellen und beginnen nun mit der Genumlagerung für die endgültige leichte Kette. Der Prä-BCR erscheint in diesem Stadium nicht mehr auf der Zelloberfläche. Ab dem Zeitpunkt, ab dem ein richtiger IgM-BCR auf der Zellmembran vorhanden ist, bezeichnet man die Zelle als unreifen B-Lymphozyten. Es folgt, ähnlich den T-Zellen, eine Selektion der unreifen autoreaktiven B-Zellen. Die Überlebenden differenzieren zu reifen B-Lymphozyten, welche zusätzlich IgD-BCR exprimieren. Diese zirkulieren nun durch Blut und Gewebe, treffen auf ein passendes Antigen und reifen dann mit Hilfe von T_H2 -Zellen in den sekundären lymphatischen Organen zu Plasmazellen aus.

2.2.1.2 Struktur von Antikörpern und BCR

Antikörper sind die Effektormoleküle der humoralen Immunantwort, wobei, wie oben beschrieben, membrangebundene Antikörper als BCR fungieren (Pernis et al., 1971). Man unterscheidet fünf verschiedene Antikörperklassen, IgM, IgD, IgG, IgA und IgE, die grundsätzlich den gleichen Aufbau besitzen, sich jedoch in ihrem Glykosylierungsmuster, ihrem Molekulargewicht und ihren biochemischen Funktionen gegeneinander abgrenzen lassen.

Antikörper sind Y-förmige Heterodimere bestehend aus zwei identischen leichten (L-Kette) und zwei schweren Polypeptidketten (H-Kette), die über nichtkovalente Bindungen und kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Man unterteilt die Ketten in verschiedene Domänen, so besteht eine L-Kette aus einer n-terminalen variablen Domäne (V_L) und einer c-terminalen konstanten Domäne (C_L). Die H-Ketten besitzen je nach Antikörperklasse entweder drei (IgG, IgA, IgD) oder vier (IgM, IgE) konstante (C_H) und eine variable Domäne (V_H). (Schroeder und Cavacini, 2010)

Die unterteilten Regionen bestehen alle aus ca. 110 bis 130 Aminosäuren und besitzen eine für Immunglobuline typische Struktur. Es handelt es sich hierbei um zwei anti-parallele β -Faltblätter, zusammen gehalten durch eine Disulfidbrücke. Diese Formation findet man in vielen weiteren Proteinen, die zur Immunglobulin-Superfamilie zählen, wie z.B. dem TCR.

Antikörper besitzen eine hohe Flexibilität, bedingt durch eine Gelenk-(hinge)Region zwischen C_{H1} und C_{H2} der schweren Ketten und die relativ beweglichen Regionen zwischen den variablen und konstanten Domänen. So können sie auch weiter auseinander gelegene Epitope gleichzeitig binden. In der hinge-Region liegen auch die Disulfidbrücken, die die beiden schweren Ketten miteinander verknüpfen.

Spaltet man ein Immunglobulin proteolytisch aminoterminal von diesen Disulfidbrücken mittels Papain, entstehen drei Fragmente, 2 Fab- und ein Fc-Fragment (Porter, 1959). Die zwei identischen Fab-Fragmente bestehen aus der kompletten leichten Kette und der V_H und C_{H1} -Domäne der schweren Kette und sind für die Antigenbindung verantwortlich (Fab = Fragment, das Antigen bindet). Sie dienen als wichtige Werkzeuge in der Forschung.

Das Fc-Fragment besteht aus den C_{H2} - und C_{H3} - bzw. C_{H4} - Domänen der beiden schweren Ketten. Es ist für die Aktivierung der Abwehrmechanismen über Bindung an Fc-Rezeptoren zuständig und wird Fc-Fragment genannt, da es sehr leicht kristallisiert.

Eine andere Protease, Pepsin, spaltet das Immunglobulin carboxyterminal der Disulfidbrücken (Nisonoff et al., 1960). So entsteht ein Fragment bestehend aus zwei verbundenen Fabs und viele kleine Fragmente der schweren Kette. Das $F(ab')_2$ -Fragment besitzt die gleichen Bindungseigenschaften wie ein Antikörper, kann jedoch ohne Fc-Teil keine Immunantwort hervorrufen.

Die variablen Domänen der Antikörper können unterteilt werden in drei hypervariable Regionen (CDRs) und vier am Rand liegende framework-Regionen mit geringerer Sequenzvariabilität. Die CDRs der schweren Kette werden mit denen der leichten Kette kombiniert und bilden so gemeinsam die Bindungsstellen für das Epitop des Antigens. Die konstanten Regionen der schweren Kette sind für die Effektor-Funktion des Antikörpers zuständig und legen die Antikörperklasse fest. So existieren 9 verschiedene Gensegmente (μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und ϵ). Die leichten Ketten sind entweder λ - oder κ -Ketten, die sich jedoch in ihrer Funktion nicht unterscheiden. (Schroeder und Cavacini, 2010)

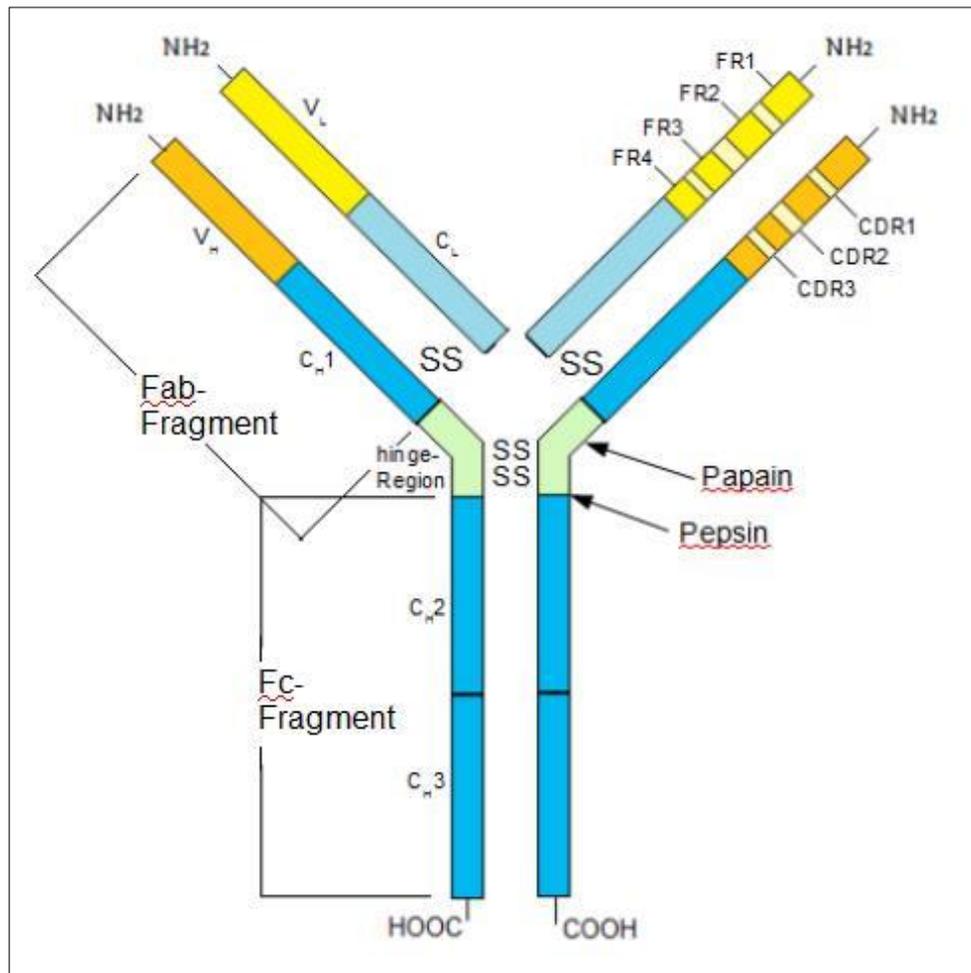


Abb.1: Aufbau eines IgG-Antikörpers; Abkürzungen: V_L : variable Domäne der leichten Kette, C_L : konstante Domäne der leichten Kette, V_H : variable Domäne der schweren Kette, C_{H1-3} : konstante Domänen der schweren Kette, SS: Disulfidbrücke, CDR: complementary determining regions, FR: framework regions, Fab: antigenbindendes Fragment, Fc: kristallisierbares Fragment; Die Schnittstellen von Papain und Pepsin wurden eingezeichnet.

Durch alternatives Spleißen der carboxyterminalen C_H -Regionen werden entweder lösliche oder membrangebundene, als Antigenrezeptor fungierende, Immunglobuline gebildet. Der BCR ist wie der TCR nach Antigenkontakt alleine nicht in der Lage Signale in die Zelle weiterzuleiten. Deshalb ist er mit einem Heterodimer aus einer $Ig\text{-}\alpha$ -Kette und einer $Ig\text{-}\beta$ -Kette assoziiert. $Ig\text{-}\alpha$ und $Ig\text{-}\beta$ werden auch als CD79A und B bezeichnet und sind untereinander über eine Disulfidbrücke verbunden. Sie besitzen sogenannte ITAM-Regionen (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) in ihrer zytoplasmatischen Domäne. Die ITAM können nach Antigenkontakt des BCR von Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden, worüber die Signalkaskade in Gang gesetzt und die B-Zelle aktiviert wird. Jede Antikörperklasse kann als BCR auf der Zelloberfläche dienen, wobei auf nativen B-Zellen nur IgM und IgD membrangebunden vorliegen. (Reth, 1992)

2.2.1.3 Funktion von Antikörpern

(Schroeder und Cavacini, 2010)

Im Allgemeinen dienen Antikörper der Erkennung von Fremdan antigenen und der Einleitung einer Bekämpfung der Pathogene oder der infizierten Zelle. Sie verknüpfen das adaptive mit dem angeborenen Immunsystem über ihre Fähigkeit zur Opsonierung von Antigenen. Makrophagen, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Granulozyten besitzen sogenannte Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und erkennen damit Antigen-Antikörper-Komplexe, phagozytieren diese oder leiten eine andere Immunantwort, z.B. Ausschüttung von Zytokinen, in die Wege. Über Fc-Rezeptoren auf Killerzellen wird die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt und Zielzellen abgetötet. Der Fab-Teil des Antikörpers übernimmt außer der Antigenerkennung noch die Aufgabe der Neutralisierung von Pathogenen, wodurch das Eindringen des Erregers in Körperzellen verhindert wird. Zusätzlich können Antikörper, die an die Oberfläche eines Erregers gebunden haben, über Bindung an C1q die Komplementaktivierung auslösen. Folglich werden Komplementfaktoren frei, die als weitere Opsonine oder Chemokine fungieren. Zudem kann ein Membranangriffskomplex gebildet werden, der die Zielzelle osmotisch lysiert.

Jedoch besitzen verschiedene Antikörpertypen auch unterschiedliche Funktionen.

IgM werden bei einer primären Immunantwort sezerniert. IgM liegt meist als Pentamer vor, kann aber auch als Hexamer vorkommen. Im Pentamer sind fünf IgM-Moleküle über intermolekulare Disulfidbrücken und die sogenannte J-Kette (J = joining) miteinander verbunden. Aufgrund dessen, dass IgM die ersten sezernierten Immunglobuline sind und noch keine somatische Hypermutation, bzw. eine Affinitätsreifung erfahren haben, besitzen sie eine geringe Affinität zum Antigen. Dies gleichen sie jedoch durch ihre erhöhte Avidität, die durch die zehn Antigenbindungsstellen im Pentamer zustande kommt, wieder aus. IgM bilden durch diese multimere Struktur sehr einfach Antigen-Antikörper-Komplexe und opsonieren Antigene hervorragend. Weiterhin sind IgM der stärkste Aktivator des Komplementsystems.

Über die Funktion des **IgD** ist momentan noch sehr wenig bekannt. Es dient als BCR auf reifen naiven B-Lymphozyten, genau wie IgM und kommt nur in sehr geringen Mengen im Serum vor.

Die anderen Immunglobulinklassen können nur durch Hilfe von CD4⁺-Zellen gebildet werden und entstehen durch den sogenannten „class switch“.

Der größte Teil der gelösten Immunglobuline im Serum wird durch **IgG** repräsentiert. Es hat die längste Halbwertszeit und kann, basierend auf strukturellen und funktionellen Unterschieden in den C_H1- und C_H3-Domänen, in vier Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) unterteilt werden. Sie wurden nach der Rangfolge benannt, in der sie im Serum vorkommen, so macht IgG1 den größten Anteil aus. Die Fähigkeit die Komplementkaskade auszulösen unterscheidet sich je nach Subklasse. IgG4 ist z.B.

überhaupt nicht in der Lage C1q zu binden, während IgG3 am besten bindet. Alle besitzen die Fähigkeit zur Opsonierung von Antigenen wobei es drei verschiedene Fc γ -Rezeptoren gibt, die ebenfalls Präferenzen für bestimmte Subtypen aufweisen. IgG1 und IgG3 sind zudem auf die Erkennung von Protein-Antigenen ausgerichtet, während IgG2 und IgG4 mit Polysacchariden reagieren. Zusätzlich sind verschiedene Subklassen in unterschiedlichem Ausmaß an Autoimmunkrankheiten beteiligt. Gemeinsam ist ihnen aber allen ihre Plazentagängigkeit und ihre Beteiligung an der Leihimmunität der Mutter an das Kind.

Das meist produzierte Immunglobulin ist jedoch nicht IgG, sondern **IgA**. Es kommt am häufigsten auf Schleimhautoberflächen, im Speichel und in der Muttermilch vor. IgA liegt im Serum als Monomer vor, wird jedoch in der Submukosa von Plasmazellen als Dimer sezerniert und enthält wie IgM eine J-Kette. Es wird von Epithelzellen aktiv aufgenommen und an die Schleimhautoberfläche transportiert. Auf diesem Wege erhält es eine sekretorische Komponente, die ab dann immer mit dem Dimer assoziiert ist. IgA schützt die Schleimhaut direkt im Lumen durch Neutralisierung von Antigenen vor dem Eindringen der Erreger. Bereits intrazelluläre Pathogene können ebenfalls noch gebunden und mittels des Transportmechanismus wieder an die Oberfläche gebracht werden. IgA ist nicht an einer Komplementaktivierung beteiligt. Jedoch kann es über auf Neutrophilen exprimierte IgA-Rezeptoren eine lokale ADCC auslösen.

IgE hat bei gesunden Menschen die geringste Serumkonzentration und die kürzeste Halbwertszeit, ist jedoch ein sehr potenter Antikörper. IgE ist assoziiert mit Allergien und Immunantworten gegen Parasiten. Es bindet mit sehr hoher Affinität an Fc ϵ -Rezeptoren auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen. Wird dann ebenfalls ein Antigen gebunden, schütten diese Zelle ihre Entzündungsmediatoren aus, was bis zu einem anaphylaktischen Schock führen kann. So wurden schon Medikamente entwickelt, die freies IgE abfangen und die Bindung an Fc ϵ -Rezeptoren verhindern sollen (D'Amato et al., 2004).

2.2.1.4 Erzeugung der Antikörpervielfalt und Klassenwechsel

Antikörper sind enorm vielfältig, können fast jedes erdenkliche Antigen erkennen, sind aber gleichzeitig auch extrem spezifisch (Landsteiner et al., 1936). Die Theorie, dass für jeden verschiedenen Antikörper ein eigenes Gen existiert wurde schnell widerlegt und durch andere Möglichkeiten zur Entstehung dieser Diversität ersetzt. Vier Vorgänge spielen dabei eine große Rolle. Zum einen ist dies die somatische Genumlagerung (Rearrangement), die während der Reifung der Zellen im Knochenmark stattfindet (Hozumi und Tonegawa, 1976). Dabei werden zahlreiche V-, D-, J- und C-Gensegmente beliebig zu einem funktionellen Gen umgelagert. Die Verknüpfung der Gensegmente erfolgt ungenau, wodurch eine zusätzliche junktionale Vielfalt entsteht (Gauss und Lieber, 1996). Weiterhin werden dann zufällig leichte mit schweren Ketten kombiniert, wodurch die Variabilität nochmals enorm gesteigert wird.

Diese Vorgänge kommen auch so in T-Zellen vor und dienen dort der Entstehung der Diversität des TCR. In B-Zellen existiert jedoch ein zusätzlicher Mechanismus, den T-Zellen nicht besitzen, die somatische Hypermutation. Sie findet erst nach Antigenkontakt und vor allem in der variablen Region der leichten und schweren Kette statt (Wagner und Neuberger, 1996).

Das Gencluster für die κ -leichte Kette eines Antikörpers liegt auf Chromosom 2 und besteht aus ca. 40 funktionellen V_{κ} -, fünf J_{κ} - und einem einzelnen C_{κ} -Segment. Jedes V_{κ} -Segment hat die Möglichkeit sich mit jedem der fünf J_{κ} -Abschnitte zu verbinden, was ein Repertoire von mehr als 140 verschiedenen VJ-Kombinationen erzeugt. Der λ -Lokus, der auf dem Chromosom 22 liegt, beinhaltet abhängig vom individuellen Haplotyp 30-36 funktionelle V_{λ} -Segmente und vier C_{λ} -Exons, von denen jedes mit einem J_{λ} -Segment assoziiert ist. Die V-Gensegmente der leichten Ketten kodieren für FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2 und den aminoterminalen Teil von CDR3. Der carboxyterminale Teil von CDR3 und FR4 wird von den J-Segmenten codiert. Die Information für den konstanten Teil der leichten Kette liegt in den C-Segmenten. (Schroeder und Cavacini, 2010)

Der Genlocus für die schwere Kette ist etwas komplexer aufgebaut. Er liegt auf Chromosom 14 und besteht aus ca. 39 funktionellen V_H - und sechs J_H -Segmenten. Hinzu kommen hier aber noch ca. 27 D_H -Segmente (Diversity), die zwischen V_H und J_H liegen und ebenfalls Information für den variablen Teil der schweren Kette tragen. Hier kodieren die V_H -Segmente für FR1, FR2, FR3, CDR1, CDR2 und den aminoterminalen Teil von CDR3. Das D_H -Stück beinhaltet die Information für den Mittelteil von CDR3 und das carboxyterminale Ende ist wieder auf dem J_H -Abschnitt codiert, genauso wie die framework-Region-4. Die Rekombination für den variablen Teil der schweren Kette beginnt immer mit einer Zusammenlagerung von D_H - und J_H -Segmenten. Erst dann wird ein V_H -Gensegment an das DJ-Teilstück angeknüpft. Gensegmente, die zwischen den zusammengefügteten Stücken liegen, werden in der Regel deletiert. Durch zufälliges Aneinanderreihen dieser Genabschnitte, existieren mehr als 10^4 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für den variablen Teil der H-Kette. Weiterhin unterscheidet sich die schwere von der leichten Kette durch 9 auf der 3'-Seite de J-Abschnittes liegende C_H -Segmente, die alle für einen anderen Antikörper-Isotyp kodieren. Sie bestehen wiederum aus verschiedenen Exons, die jeweils die Information für eine C_H -Domäne im Immunglobulin besitzen. (Schroeder und Cavacini, 2010)

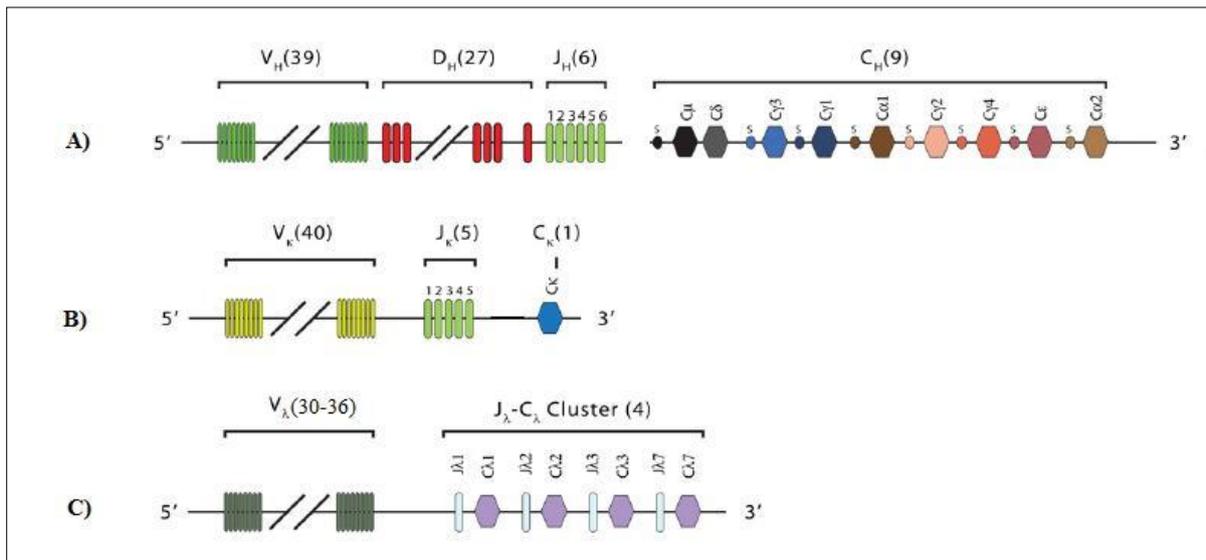


Abb.2: Organisation des Genclusters der schweren und leichten Kette von Immunglobulinen;

A) Chromosom 14 mit dem Aufbau des Genclusters für die schwere Kette; **B)** Chromosom 2 mit Aufbau des κ-Genclusters; **C)** Chromosom 22 mit Aufbau des λ-Genclusters (modifiziert nach Schroeder und Cavacini, 2010)

Der Prozess der Genumlagerung vollzieht sich folgendermaßen (Nishana und Raghavan, 2012): Die zum Rearrangement fähigen DNA-Abschnitte sind durch sogenannte RSS (recombination signal sequence) gekennzeichnet. Dies sind sehr konservierte DNA-Bereiche, die jedes Gensegment umgeben und aus einem Heptamer (sieben Nukleotide) und einem Nonamer (neun Nukleotide) getrennt durch einen entweder 12 oder 23 bp langen Spacer bestehen. Die V(D)J-Genumlagerung erfolgt nach der 12-23-Regel. Diese besagt, dass immer nur Genabschnitte, denen eine RSS mit einem 12 bp langen Spacer angelagert ist, mit einem Genabschnitt, markiert durch eine RSS mit einem 23 bp langen Spacer, kombiniert werden können und umgekehrt. So wird, z.B. im Falle der schweren Kette, die direkte Verknüpfung eines V_H- mit einem J_H-Segment verhindert.

Besondere Enzyme namens RAG1 und RAG2 (Recombination Activating Gene), die nur in T- und B-Lymphozyten vorkommen, erkennen die RSS und binden daran. Sie induzieren DNA-Strangbrüche genau an der Grenze zwischen dem kodierenden Segment und Heptamer der RSS. So entstehen freie DNA-Enden an der codierenden Region, die sich zu einer Haarnadel-Struktur zusammenfügen. Diese Haarnadeln, sind die Stellen, an denen die verschiedenen Gensegmente verknüpft werden. Durch Veränderungen in diesem Bereich wird eine zusätzliche Antikörpervielfalt ermöglicht, was man auch als junktionale Vielfalt bezeichnet. Die Haarnadel kann asymmetrisch gespalten werden. Da dann die einzelsträngige DNA Nukleotide enthält, die vorher komplementär waren, entstehen palindromische Sequenzen (P-Nukleotide) in der CDR3-Region. Weiterhin kann die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) zufällig einige Nukleotide ersetzen oder an die DNA-Einzelstränge anheften. So entstehen CDR3-Regionen, die in ihrer Länge und Struktur sehr variabel sind.

Die fertigen V(D)J-Segmente für die variable Region müssen jetzt noch mit einem C-Segment verknüpft werden. In der schweren Kette geschieht dies, je nachdem welcher Immunglobulin-Isotyp entstehen soll, mit einem ganz bestimmten C_H-Segment. Naive B-Zellen exprimieren nur IgM und IgD auf ihrer Oberfläche. Im Falle des IgM bricht die Transkription nach Erreichen des 3'-Endes des μ -Gens einfach ab. Soll IgD gebildet werden entsteht erst eine Prä-mRNA die μ - und δ -Gen enthält. Das μ -Gen wird durch Spleißen entfernt und das VDJ-Segment direkt mit dem δ -Gen verknüpft.

Nach Antigenkontakt der B-Zelle und Aktivierung durch eine T-Helferzelle, kommt es zum „class switch“ und es können auch IgG, IgA und IgE produziert werden. Vor jedem C_H-Gensegment, mit Ausnahme des C_δ-Gens, befindet sich ein DNA-Abschnitt, der als Switch-Region bezeichnet wird. Während der CSR (Class Switch Recombination) leitet die AID (Activation-Induced Desaminase) einen Prozess ein, in dem es zu DNA-Brüchen in diesen Regionen und zur Deletion der nicht benötigten C_H-Gene kommt. So können VDJ-Segmente z. B. direkt mit dem C γ 1-Gen verbunden werden, was zur Sekretion von IgG1 durch B-Zellen führt. (Stavnezer et al., 2008)

Ein weiterer Mechanismus trägt im Rahmen der sekundären Immunantwort zu Erhöhung der Antikörpervielfalt und Affinität gegen ein Antigen bei, die somatische Hypermutation. Der Mechanismus ist noch relativ unbekannt, jedoch weiß man, dass durch Punktmutationen im variablen Bereich der leichten und der schweren Kette, Antikörper entstehen können, die eine höhere Affinität gegen das Antigen aufweisen. B-Zellen mit diesen Antikörpern konkurrieren erfolgreich um die Antigenbindung und erhalten folglich mehr Signale zur Proliferation. B-Zellen mit Antikörpern geringerer Affinität gehen in Apoptose. Diesen Vorgang bezeichnet man insgesamt als Affinitätsreifung der Immunglobuline. (Papavasiliou und Schatz, 2002; Basso und Dalla-Favera, 2015)

2.2.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten stellen die zelluläre Abwehr des adaptiven Immunsystems dar. Alle reifen T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche einen TCR und CD3-Moleküle, die sie als T-Zellen kennzeichnen. Weiterhin unterscheidet man ob eine Zelle zusätzlich CD4- oder CD8-Moleküle trägt.

CD8⁺-T-Lymphozyten werden auch als zytotoxische T-Zellen (CTL) oder T-Killerzellen bezeichnet (Davis und Bjorkman, 1988). Ihre Aufgabe ist es über pMHC-I-Komplexe kranke, maligne oder fremde Körperzellen zu erkennen und diese abzutöten. Dies geschieht über freigesetzte Stoffe aus zytolytischen Granula, z.B. Perforine, die Löcher in die Zellwand einbringen und die Targetzellen in die Apoptose führen (Smith, 2014).

Eine weitere Möglichkeit die Apoptose von erkrankten Zellen auszulösen, ist die Bindung des Apoptose-Rezeptors Fas mit einem Fas-Liganden, der auf aktivierten CTLs exprimiert wird (Chu et al., 1995).

CD4⁺-T-Lymphozyten bezeichnet man als T-Helferzellen, die dazu bestimmt sind, durch Ausschüttung von Zytokinen andere Immunzellen, wie z.B. Makrophagen oder B-Lymphozyten zu regulieren bzw. zu stimulieren. Sie erkennen Antigene, die ihnen von APZ im MHC-II-Molekül präsentiert werden. Anhand der verschiedenen Zytokinmuster, die die Zellen exprimieren, kann man zwei Subpopulationen an Helferzellen unterscheiden, die T_H1- und die T_H2-Zellen (Constant und Bottomly, 1997). Sie gleichen sich in ihren Oberflächenmolekülen, unterscheiden sich jedoch durch die Funktion, die sie ausüben. Aus naiven T_H0-Zellen entwickeln sich, je nach Zytokinmuster in der Umgebung, T_H1- oder T_H2-Zellen. IL-12 bewirkt eher eine Differenzierung zu T_H1-Zellen, IL-4 bringt die Zelle dazu, sich zu einer T_H2-Zelle zu entwickeln.

Die Untergruppe der T_H1-Zellen sezerniert vor allem Zytokine, die mit einer Entzündung und der zellvermittelten Abwehr assoziiert sind, wie z.B. IL-2, IFN- γ , TNF- β . Diese führen vor allem zu einer Aktivierung von Makrophagen und somit zu einer guten Abwehr gegen intrazelluläre Erreger. Im Gegensatz dazu induzieren die T_H2-Zellen eine humorale Antikörper-vermittelte Immunantwort, die bei der Vernichtung extrazellulärer Erreger eine große Rolle spielt. Sie schütten IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 aus, wodurch B-Zellen stimuliert werden, zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausreifen und zum Antikörperklassenwechsel angeregt werden (Constant und Bottomly, 1997). Weiterhin kann durch die T_H2-Zelle eine IgE-vermittelte allergische Immunantwort gegen Fremdstoffe ausgelöst werden.

Die beiden unterschiedlichen Immunantworten, durch T_H1- oder T_H2-Zellen vermittelt, laufen meist nicht gleichzeitig ab. Werden Makrophagen aktiviert und eine Entzündung wird in die Wege geleitet, wird die Antikörper-Produktion gehemmt und umgekehrt. Dies geschieht dadurch, dass das von T_H1-Zellen produzierte INF- γ die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen hemmt. IL-4, sezerniert von T_H2-Zellen, unterdrückt die Entstehung von T_H1-Zellen und IL-10 ist ein starker Makrophagen-Inhibitor (Ding et al., 1993).

Mittlerweile hat man herausgefunden, dass noch weitere T_H-Zellen existieren müssen, da man einige Befunde in Bezug auf Autoimmunkrankheiten nicht mit dem T_H1-T_H2-Schema erklären konnte. Man entdeckte eine weitere Zelllinie, die T_H17-Zellen, die sich durch ihr Zytokinmuster von den anderen T_H-Zellen abgrenzen ließen (Weaver et al., 2007). T_H17-Zellen sezernieren IL-17, TNF- α , GM-CSF und IL-6 und benötigen IL-23 als wichtigen Überlebensfaktor. Die T_H17-Zellen und die durch sie ausgelöste Immunreaktion spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der Rheumatoiden Arthritis und anderen Autoimmunkrankheiten (Weaver et al., 2007).

Zusätzlich gibt es noch regulatorische T-Zellen, die überschwängliche Immunreaktionen abfangen und T-Memory-Zellen, die bei einer nachfolgenden Erkrankung mit einem identischen Erreger fähig sind, eine schnellere und spezifischere Immunantwort auszulösen.

2.2.2.1 Entwicklung der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche charakteristischer Weise zum Thymus auswandern, um sich dort zu reifen T-Lymphozyten zu entwickeln. Durch Veränderung der Zelloberflächenantigene kann man verschiedene Stadien der Reifung definieren. (Reinherz und Schlossman, 1980)

Aus dem Knochenmark auswandernde Vorläuferzellen besitzen noch keine für T-Lymphozyten charakteristischen Oberflächenmoleküle und keine TCR. Im Thymus entwickeln sie diese Strukturen und reifen zu doppelt positiven $CD4^+CD8^+$ -T-Lymphozyten heran, die einen zweiphasigen Selektionsprozess durchlaufen (Teh et al., 1988). In der kortikalen Zone des Thymus findet die positive Selektion statt. Dabei wird überprüft, ob der neu gebildete TCR in der Lage ist körpereigene MHC-Moleküle zu erkennen. Erfolgt eine Bindung mit niedriger Affinität zwischen T-Zelle und MHC-Molekül, erhält die Zelle ein Überlebenssignal. Bei der negativen Selektion, die sich in der Medulla des Thymus abspielt, werden den Zellen Peptide von körpereigenen Proteinen in den MHC-Molekülen präsentiert. Findet hier eine Bindung mit hoher Affinität zwischen den Zellen und den pMHC-Komplexen statt, werden diese Zellen in die Apoptose geleitet. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als zentrale Toleranz. Er ist jedoch nicht 100% effektiv, da nicht alle körpereigenen Antigene während dieser Phase den T-Lymphozyten präsentiert werden. Als periphere Toleranz bezeichnet man den Vorgang, wenn autoreaktive Zellen außerhalb des Thymus eliminiert werden. Fehler in der peripheren oder zentralen Toleranz können dann zu Autoimmunkrankheiten führen. (Starr et al., 2003)

Anschließend erfolgt die Differenzierung der doppelt positiven $CD4^+CD8^+$ -T-Lymphozyten in einzeln positive $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen. Reagiert der TCR mit einem MHC-I-Molekül, reifen die Zellen zu $CD8^+$ -T-Lymphozyten, bindet er an ein MHC-II-Molekül, entstehen $CD4^+$ -T-Lymphozyten. (The et al., 1988; Kisielow et al., 1988)

Weniger als 5% der T-Lymphozyten überleben diese Prozedur, verlassen den Thymus als reife $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen und gelangen in die peripheren lymphatischen Organe, wie Milz, Lymphknoten und Blut.

2.2.2.2 Der T-Zell-Rezeptor

Der T-Zell-Rezeptor ist das Molekül auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten, mit dem sie sie in MHC-Komplexen präsentierte Antigene erkennen. Er ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α - und einer β -Kette, die in der Nähe der Zellmembran über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind.

Der TCR zählt, wie die Immunglobuline, die MHC-Moleküle und zahlreiche andere Proteine, zu der Immunglobulin-Superfamilie (Hedrick et al., 1984). Das ist eine heterogene Gruppe an Proteinen, die Sequenz- und Strukturähnlichkeiten aufweisen. In der Tat ist auch die genetische Organisation sehr

ähnlich zu der von Antikörpern. Die α - und die β -Kette bestehen aus 4 verschiedenen Domänen, einer variablen, einer konstanten, einer transmembranösen und einer kurzen intrazellulären Domäne ohne Tyrosinkinaseaktivität.

Die variable und konstante Domäne entsteht durch Genumlagerung zahlreicher diskontinuierlicher Gensegmente. So werden im Falle der β -Kette variable (V), diversifizierende (D), verbindende (J) und konstante (C) Gensegmente rearrangiert und zu einem Gen zusammengesetzt. Bei der α -Kette fehlen die D-Gensegmente (Davis und Bjorman, 1988). Durch die Vielzahl der Teilregionen und den zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten entsteht eine enorme Mannigfaltigkeit der TCR. Man schätzt, dass mehr als 10^{11} verschiedene TCR erstellt werden können (Clevers et al., 1988).

Die variablen Ketten der α - und β -Kette besitzen an ihrem n-terminalen extrazellulären Ende jeweils drei hypervariable Bereiche, die sogenannten CDR (complementarity determining regions) zur Erkennung des pMHC-Komplexes. Die β -Kette besitzt eine zusätzliche hypervariable Region (HV4), die eine Rolle bei der Bindung von Superantigenen spielt (Garcia et al., 1996).

Der TCR ist wie der BCR nach Antigenkontakt nicht alleine in der Lage Signale in die Zelle weiterzuleiten, deshalb ist er mit dem CD3-Komplex und ζ -Proteinen vergesellschaftet. Diese Co-Rezeptoren dienen nicht nur der Signaltransduktion, sondern helfen auch bei dem Zusammenbau des TCR und dem Transport an die Zelloberfläche (Clevers et al., 1988). Sie bestehen aus zwei Heterodimeren, CD3 γ/ϵ und CD3 δ/ϵ und einem ζ -Homodimer, die alle jeweils extrazelluläre, transmembranöse und lange intrazelluläre Domänen für die Signalweiterleitung besitzen. Wichtige Strukturen hierbei sind auch hier die ITAM-Regionen, wovon jede CD3-Kette eine und jede ζ -Kette drei Stück besitzt (Cambier, 1995). Nach Antigenkontakt des TCR verändert sich die Konformation des TCR-CD3-Komplexes und die ITAM können von Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden, was die Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle in die Wege leitet.

Am Ende der Signalkaskade führt dies zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und so zur Aktivierung Calcium-abhängiger Proteinkinasen, die zur klonalen T-Zell-Proliferation führen (Smith, 2014).

Weiterhin sollte man erwähnen, dass es nicht nur einen α/β -TCR, sondern auch einen γ/δ -TCR gibt. Diesen tragen ca. 5% der T-Lymphozyten. Sie kommen vorwiegend im epithelialen Gewebe vor und sind meist doppelt negativ für CD4 und CD8. Die Vielfalt des γ/δ -TCR ist nicht so groß wie die des α/β -TCR, da für die γ - und δ -Ketten weniger Gensegmente zum Umlagern vorhanden sind (Davis und Bjorkman, 1988). γ/δ -TCR tragende Zellen scheinen an der Immunantwort gegen Bakterien und Parasiten beteiligt zu sein, primär erkennen sie Phosphoantigene von Mykobakterien über einen noch unklaren Mechanismus. Weitere identifizierte Liganden sind das CD1-Molekül und nichtklassische MHC-Moleküle der Klasse 1b, wie z.B. T10 und T22 (Rudolph et al., 2006).

Die Funktion dieses TCR ist jedoch noch nicht genau bekannt und weiterhin Gegenstand der Forschung. Bereits erkannt wurde, dass die antimikrobielle Abwehr, die Organhomöostase, und Reparatur von Gewebeschäden zu dessen Funktionen zählen (Cruz et al., 2018).

γ/δ -TCR tragende Zellen sind bekannt für ihre schnellen und MHC-unabhängigen Immunantworten, wie z.B. die Produktion von Zytokinen und ihre Zytotoxizität. Weiterhin wird eine wichtige Rolle von γ/δ -T-Lymphozyten in der Verhinderung einer malignen Zellentartung in Gewebe gesehen, wodurch viel Hoffnung auf diesen Zellen liegt bezüglich einer zukünftigen Krebsimmuntherapie. (Mikulak et al., 2019)

2.3 MHC-Moleküle als Instrument der Antigenpräsentation

MHC-Moleküle sind Membranglykoproteine, auf die man erstmals im Zusammenhang mit Transplantationsabstoßungen aufmerksam wurde. MHC (major histocompatibility complex) ist ein Spezies-unabhängiger Begriff. Beim Menschen werden diese als HLA-Moleküle (Humanes Leukozytenantigen) bezeichnet, da man sie zuerst auf Leukozyten nachweisen konnte.

Man unterscheidet zwei verschiedene Klassen, I und II, die sich auf unterschiedlichen Zelltypen befinden und unterschiedliche Funktionen aufweisen.

Allgemein dienen sie der Antigenpräsentation für T-Zellen und spielen somit eine wichtige Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Im Gegensatz zu B-Lymphozyten, die auch lösliche native Antigene erkennen, sind T-Lymphozyten nur dann in der Lage Antigene zu erkennen und eine adäquate Reaktion auszulösen, wenn diese ihnen als pMHC-Komplexe präsentiert werden. Dieses Phänomen bezeichnet man auch als MHC-Restriktion (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Antigene werden intrazellulär prozessiert, an MHC-Moleküle gebunden, gelangen dann an die Zelloberfläche und können dort von T-Lymphozyten erkannt werden (Babbitt et al., 1985).

Prinzipiell kann man sagen, dass MHC-Moleküle der Klasse I endogene Peptide binden und darbieten, wohingegen MHC-Moleküle der Klasse II exogene Antigene, die durch Endozytose aufgenommen wurden, nach außen hin präsentieren. Da $CD8^+$ -T-Zellen pMHC-I-Komplexe und $CD4^+$ -Zellen pMHC-II-Komplexe erkennen, resultieren daraus verschiedene Immunantworten. Obwohl dies soweit als korrekt angesehen wird, ist es auch möglich, dass exogene Peptide durch MHC-I-Moleküle präsentiert werden und damit eine $CD8^+$ -T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen. Dieses Ereignis bezeichnet man dann als Kreuzpräsentation. (Trombetta und Mellman, 2005)

Die polymorphen Gene des HLA-Komplexes liegen beim Menschen auf dem Chromosom 6 und bestehen aus jeweils drei Hauptgenen (Klasse I: HLA-A, HLA-B und HLA-C, Klasse II: HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR). Die Genloki des HLA-II-Moleküls codieren für eine α - und eine β -Kette. Das Gen für die β -Kette des HLA-I-Komplexes liegt auf Chromosom 15. Für jeden Gen-Lokus sind bereits

zahlreiche Allele bekannt, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Menschen identische HLA-Moleküle besitzen extrem gering ist. (Klein und Sato., 2000)

2.3.1 MHC II

Die MHC-Peptidrezeptoren der Klasse II befinden sich auf allen Antigen präsentierenden Zellen, wie z.B. auf Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Epithelzellen des Thymus. Sie dienen dort der antigenspezifischen Aktivierung von CD4⁺-Zellen (Rosenthal et al., 1973), welche dann B-Zellen bei der Einleitung der Antikörperproduktion behilflich sein können (Katz et al., 1973).

Weiterhin wurde gezeigt, dass auch andere Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen (Choi et al., 2004), andere Epithelzellen (Bottazzo et al., 1983) und Tumorzellen (Thibodeau et al., 2012) unter physiologischen und/oder pathologischen Bedingungen MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufweisen können. Die Antigenpräsentation durch diese nicht zu den APZ zählenden Zellen, kann zu Gewebeschäden im Rahmen von Autoimmunkrankheiten führen oder das Überleben von Tumorzellen beeinflussen.

2.3.1.1 Antigenbeladung der HLA Klasse II-Moleküle

Wie bereits oben beschrieben, dienen MHC-II-Moleküle vorwiegend der Präsentation extrazellulärer Peptide. Diese werden von APZ durch Endozytose oder Phagozytose aufgenommen und in den Endosomen durch zahlreiche Proteasen zu Peptidfragmenten verdaut.

Die α - und β -Kette der MHC-II-Moleküle werden von Ribosomen am Endoplasmatischen Retikulum produziert und mit Hilfe von Chaperonen gefaltet und zusammengebaut. Im Gegensatz zu den MHC-I-Molekülen, werden diese nicht im ER mit einem Antigen beladen, sondern sind an ihrer Peptidbindungsstelle durch eine invariante Kette blockiert.

In Membranvesikel eingeschlossen, werden die zur Beladung bereiten HLA-II-Moleküle über den Golgi-Apparat ins Zytoplasma geschickt.

Dort fusionieren sie mit den Peptidfragment-haltigen Endosomen zu einem sogenannten MHC Klasse II-Kompartiment. Mit Hilfe von Kathepsinen und Proteinasen findet darin der teilweise Abbau der invarianten Kette und der Austausch gegen ein mindestens 13 AS langes Antigenfragment statt. HLA-DM- und HLA-DO-Moleküle, die ebenfalls im ER produziert wurden, unterstützen bei der Beladung und dem folgenden Transport der fertigen pMHC-II-Komplexe an die Zelloberfläche. (Klein und Sato, 2000; Trombetta und Mellman, 2005)

Auf der Zelle angekommen, sind sie bereit ihre Antigene T-Helferzellen zu präsentieren und eine mögliche Immunantwort auszulösen.

2.3.1.2 Aufbau der HLA Klasse II-Moleküle

Das MHC-II-Molekül setzt sich aus einer α - und einer β -Kette zu einem symmetrischen Heterodimer zusammen. α - und β -Kette sind nichtkovalent miteinander verbunden und durchspannen beide die Plasmamembran.

Sie bestehen jeweils aus vier Domänen, $\alpha 1$ und $\beta 1$, $\alpha 2$ und $\beta 2$, der Transmembranregion und dem zytoplasmatischen Anteil.

Die $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Domänen formen gemeinsam eine Peptidbindungstasche, in der das zu präsentierende Antigen gebunden wird. Die $\alpha 2$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten ähneln in ihrem Aufbau der konstanten Region eines Immunglobulins. Zusätzlich dient die $\beta 2$ -Domäne als Bindungsstelle für das CD4-Molekül der T-Zelle.

Bei den HLA-II-Komplexen ist die Peptidbindungsfurche weiter geöffnet als im HLA-I-Komplex, was dazu führt, dass größere Peptide gebunden werden können und die Peptidenden besser zugänglich sind. (Klein und Sato., 2000)

2.3.2 MHC I

Fast alle kernhaltigen Zellen eines Organismus exprimieren MHC-Moleküle der Klasse I auf ihrer Oberfläche. Damit liefern sie den zytotoxischen T-Zellen Informationen darüber, welche Proteine im Zellinneren produziert werden und weisen sich somit als gesunde oder infizierte bzw. maligne Zellen aus. Mit einem Virus befallene Zellen können dessen Antigene an ihrer Zelloberfläche im MHC-Komplex präsentieren und dadurch CD8⁺-T-Zellen aktivieren (Zinkernagel und Doherty, 1974). Kernlose Erythrozyten und Trophoblasten besitzen keine MHC-I-Moleküle.

2.3.2.1 Antigenbeladung der HLA Klasse I-Moleküle

Ein spezifisches Protein, namens Ubiquitin, markiert in der Zelle andere alte oder defekte Proteine, die abgebaut werden sollen. Diese werden mit Hilfe von Chaperonen entfaltet und anschließend durch das Proteasom, einen multikatalytischen Komplex, zu kleinen Peptidfragmenten oder einzelnen Aminosäuren verarbeitet (Goldberg et al., 1992).

Über einen ATP-abhängigen TAP (transporter associated with antigen processing)-Transporter werden die entstandenen Peptidfragmente in das Lumen des rER transportiert. Dort sitzen bereits die von Ribosomen produzierten MHC-I-Moleküle. Sie sind im unbeladenen Zustand noch mit Chaperonen assoziiert und fest an ein TAP-Molekül gebunden. Sobald ein passendes Antigen die Peptidbindungstasche erreicht, löst sich die Bindung und ein vollständiger pMHC-Komplex entsteht. (Klein und Sato., 2000)

Erst dann wird die endgültige Faltung und die komplette Stabilität erlangt (Fahnestock et al., 1992).

Nun werden sie über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Sobald eine zytotoxische T-Zelle in einem MHC-I-Molekül ein körperfremdes Antigen erkennt, wird die präsentierende Zelle eliminiert.

2.3.2.2 Aufbau der HLA Klasse I-Moleküle

Man unterteilt die MHC-I-Moleküle beim Menschen in HLA-A, HLA-B und HLA-C. Alle besitzen den gleichen Grundaufbau.

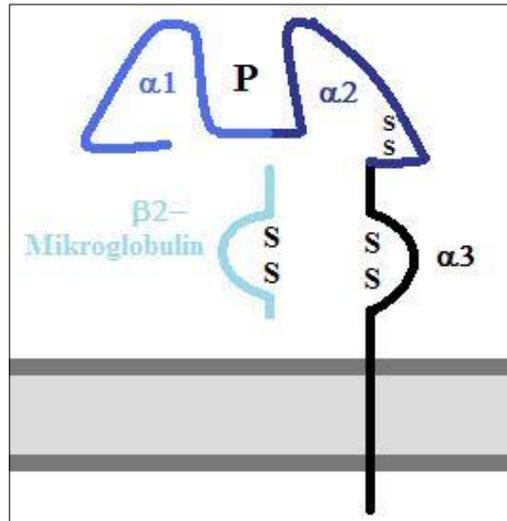


Abb.3: Schematische Darstellung eines MHC-I-Moleküls; P kennzeichnet die Peptidbindungsstelle

Die Struktur der HLA-A2-Moleküle wurde erstmals durch Björkman et al. 1987 mittels Röntgenstrukturanalysen aufgedeckt. HLA-Moleküle der Klasse I sind zusammengesetzte Heterodimere aus einer schweren α -Kette und einer nichtkovalent gebundenen leichten Kette, dem β 2-Mikroglobulin. Die α -Kette durchspannt als einzige die Zellmembran und besteht aus fünf Untereinheiten, α 1, α 2, α 3, der Transmembranregion und dem zytoplasmatischen Anteil. Die polymorphen α 1- und α 2-Domänen bilden die Peptidbindungstasche. Die α 3-Untereinheit und das β 2-Mikroglobulin sind weniger polymorph und ähneln in ihrem Aufbau den konstanten Regionen eines Immunglobulins. Alle sind aus ca. 90 Aminosäuren aufgebaut. Die α 1- und α 2-Domänen gleichen sich in ihrer Struktur, sie besitzen beide vier β -Faltblatt-Strukturen und eine lange α -Helix. Die α 2-Domäne hat zusätzlich noch eine kurze α -Helix, die an die längere angegliedert ist. Zusammen modellieren diese Strukturen eine Bindungs-Plattform für das Antigen, bestehend aus einem Boden aus acht β -Faltblatt-Strukturen, seitlich überdacht von den α -Helices.

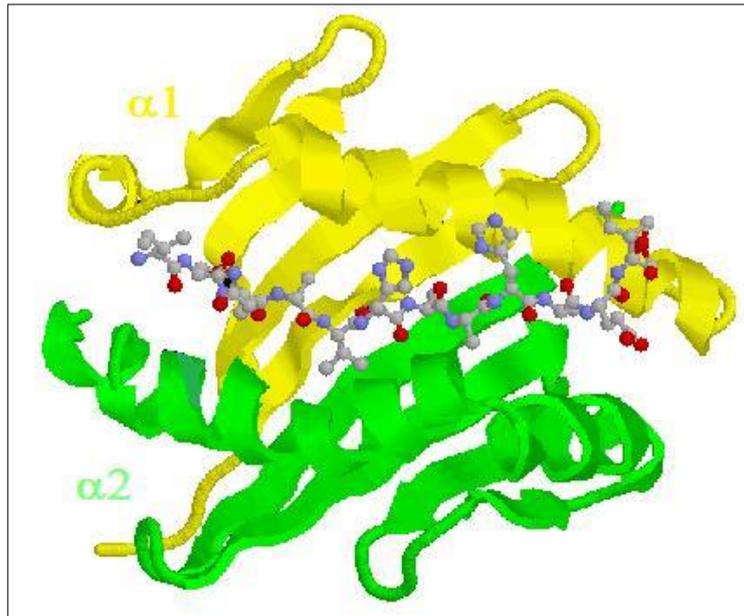


Abb.4: Struktur eines pMHC-Komplexes aus Sicht des TCR; In der Antigenbindungstasche zwischen der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette ist ein entfaltetes Peptid gebunden, (modifiziert nach Bjorkman et al., 1987)

Das aus 7-15 Aminosäuren bestehende Antigen wird entfaltet darin gebunden. Die Spalte hat eine inhomogene Oberfläche, es befinden sich darin sechs Taschen (A bis F) für die Bindung einiger der Seitenketten der Aminosäuren. Meist haben zwei oder drei Taschen (B, C und F) einen besonderen Einfluss auf die Peptidbindung und legen somit fest, welche Antigene von diesem HLA-I-Molekül gebunden werden können. Die Seitenketten des Peptids, die in diese Taschen passen, werden dann auch als Ankerstellen bezeichnet. Ein bestimmtes HLA-Molekül hat die Möglichkeit tausende verschiedener Peptide zu binden, die sich nur in ihren Ankerstellen ähneln. Durch den Polymorphismus der HLA-Moleküle, können unterschiedliche HLA-Typen auch verschiedene Antigene besser oder schlechter binden. (Klein und Sato., 2000)

Dies erklärt auch zum Teil die individuelle Anfälligkeit der Menschen für verschiedene Krankheiten oder die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems (Bjorkman et al., 1987).

2.4 Interaktion zwischen TCR und pMHC-Komplex

Der TCR erkennt mit seinen hypervariablen Regionen (CDRs) den pMHC-Komplex und leitet eine T-Zell-Aktivierung ein. Er positioniert sich diagonal über der Peptidbindungsfurche des MHC-Moleküls, sodass die CDR1- und CDR2-Regionen der α -Kette des TCR mit dem n-terminalen Ende des Peptides in Kontakt kommen und die CDR1- und CDR2-Regionen der β -Kette über dem c-terminalen Ende liegen. Die zentral liegenden CDR3-Regionen der α - und β -Kette platzieren sich über den nach oben gewandten Seitenketten des Peptides. Die weniger variablen CDR1- und CDR2-Regionen interagieren

so vor allem mit den relativ konservierten Resten der α -Helices des HLA-Moleküls, während die variablen CDR3-Regionen den größten Teil des Peptides erkennen. (Klein und Sato, 2000; Rudolph et al., 2006)

Die für eine T-Zell-Aktivierung wichtigen Kontaktpunkte des TCR am MHC-Molekül, vor allem am HLA-A*0201, wurden in einigen Studien detailliert untersucht. Bedingt durch die große Vielfaltigkeit der TCR und der MHC-Moleküle, stellt jede Bindung ein individuelles Ereignis ohne einheitliche Kontaktpunkte dar. Jedoch fand man Stellen im HLA-Molekül, die öfter als andere mit dem TCR interagieren.

Baker et al. untersuchten 2001 zuerst den A6 TCR, welcher spezifisch an den HTLV-I Tax₁₁₋₁₉/HLA-A2-Komplex bindet. Durch Strukturanalysen des trimolekularen Komplexes konnten 15 Aminosäuren in der schweren Kette des HLA identifiziert werden, die für die Bindung eine wichtige Bedeutung haben könnten. Um dies näher einzugrenzen wurden an die bekannten Kontaktstellen der α 1- und α 2-Helix Mutationen eingebracht. Die Interaktion zwischen den mutierten löslichen pMHC-Komplexen und den T-Zell-Rezeptoren wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Zusätzlich konnten Zellen hergestellt werden, die die mutierten Komplexe auf der Oberfläche tragen. Dies geschah durch Transfektion von Hmy2.C1R Zellen mit Plasmiden, die die gewünschte Information für die mutierten HLA-A2- Komplexe trugen. Die transfizierten Zellen wurden dazu verwendet, die T-Zell-Aktivierung mit Hilfe spezieller T-Zell-Assays, wie z.B. Messung der Zelllyse oder der INF- γ - und MIP-1 β -Ausschüttung, zu quantifizieren. Die Ergebnisse zeigten, dass nur zwei Mutationen, nämlich R65A und K66A, die Bindung des TCR am Tax/HLA-Komplex stark beeinflussten. Um dies auf alle T-Zell-Rezeptoren verallgemeinern zu können wurde die Versuchsreihe erweitert. Unter anderem wurden der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex und drei weitere pMHC-Komplexe mit dafür spezifischen CTL untersucht und herausgefunden, dass auch die Position 155 einen wichtigen Kontaktpunkt darstellt (Wang et al., 2002).

Rudolph et al. bestätigten 2006, dass die Interaktion zwischen TCR und pMHC-Komplex vor allem in den zentralen Bereichen der α 1- und α 2-Helices, an den Stellen 65 und 155, stattfindet. Diese „hot spots“ der Bindung sind in Abbildung 5 am Model eines HLA-A-Komplexes dargestellt.

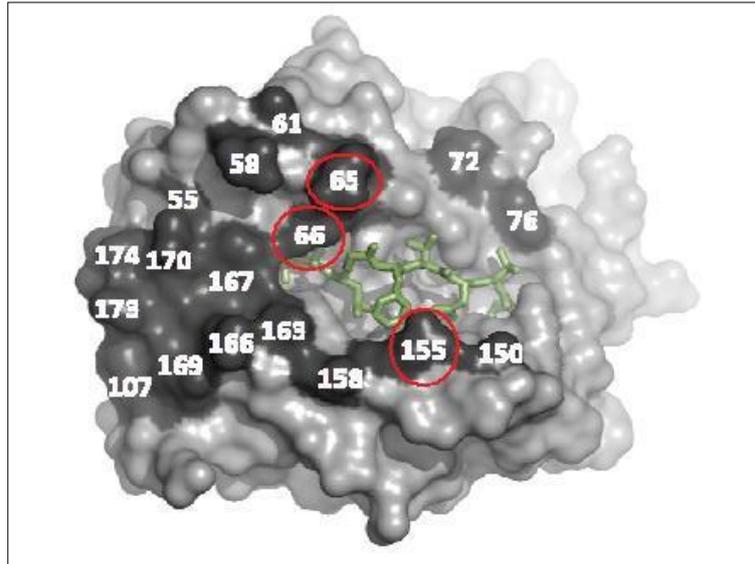


Abb.5: Bindungsstellen des TCR am HLA-A*0201-Komplex

3 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

2000 generierten Chames et al. mittels Phage-Display-Technologie einen Fab-Antikörper, der spezifisch einen pMHC-Komplex gebunden hat.

Diese Phage-Display-Methode (de Haard et al., 1999) beruht auf einer Antikörper-Library, die aus einer großen Anzahl menschlicher naiver B-Zellen erstellt wurde. Man hat die DNA peripherer Blutlymphozyten von vier gesunden Spendern und tumorfreies Milzgewebe eines Spenders mit Magenkarzinom dazu verwendet, das Repertoire der V_{μ} -Gene zu amplifizieren und in einen Phagemid-Vektor zu klonieren, um somit eine Vielzahl an Fab-Fragmenten auf Phagen zu exprimieren.

Mit der gleichen Antikörper-Library gelang es inzwischen mehrfach Fab-Antikörper zu generieren, die pMHC-I-Komplexe in einer ähnlichen Art und Weise wie TCR erkennen. Dies waren vor allem Virus- und Tumorantigene präsentiert im HLA-A*0201-Molekül (Held et al., 2004; Wadle et al., 2006; Held et al., 2007).

Da jene Phagenbank auf einem humanen Immunglobulin Repertoire basiert, stand die Frage im Raum, ob solche Antikörper auch tatsächlich im Menschen exprimiert werden.

Hierzu wurden humane Seren durch ELISA hinsichtlich der Existenz von Antikörpern untersucht, die spezifisch mit von Influenza Matrix Protein (IMP) stammenden Peptid₅₈₋₆₆ im Kontext von HLA-A*0201 interagiert. Unter 653 gesunden Probanden, Blutspendern und Wöchnerinnen wurden hoch-titrierte HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifische IgG-Antikörper in elf Frauen mit stattgehabten Schwangerschaften und einem Mann nachgewiesen. Alle diese Probanden exprimierten kein HLA-A*0201. Die Antikörper waren von identischer Spezifität wie HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-spezifische

zytotoxische T-Zellen, in dem sie weder mit HLA-A*0201 noch mit dem Peptid in der isolierten Form interagierten. In HLA-A*0201 positiven Probanden konnten derartige Antikörper nicht nachgewiesen werden. Die Antikörper waren nicht kreuzreagierend gegen andere Selbst-MHC Klasse-I Allele, wenn sie das Peptid IMP₅₈₋₆₆ präsentierten. Interessanterweise interagierten sie aber Peptid-spezifisch mit Allelen von den nicht HLA-identischen Kindern, wenn diese das Peptid IMP₅₈₋₆₆ präsentierten. (Held et al., 2015)

Für weiterführende Analysen war die Spezifität der IgG-Antikörper von großem Interesse. Man hat diese mittels einer Testung auf 166 weitere pMHC-Komplexe untersucht. Zum einen identifizierte man einige sehr spezifische Serumantikörper, die ausschließlich das virale Peptid banden, jedoch keines der 166 Kontroll-Peptide. Zum anderen wurden Immunglobuline identifiziert, die eine sehr distinkte Kreuzreaktivität aufwiesen, indem sie sowohl gegen den IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex, als auch gegen alle Peptide mit einem Glycin als n-terminale Aminosäure reagierten, wenn sie im Kontext von HLA-A*0201 präsentiert wurden. (noch unpublizierte Ergebnisse)

Insgesamt waren diese Ergebnisse absolut neu, da bisher das Dogma galt, dass nur TCR prozessierte Antigene in MHC-Komplexen erkennen können und die Interaktion von Antikörpern auf unprozessierte naive Antigene beschränkt sei. So bedingen sie eine neue Sichtweise auf das adaptive Immunsystem mit seinen zwei Kompartimenten. Laut diesen Erkenntnissen könnten B-Lymphozyten mit identischen Zielstrukturen wie der TCR der T-Lymphozyten interagieren.

Deshalb ist die Zielsetzung dieser Arbeit den Bindungsmodus der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifischen Serumantikörper zu charakterisieren und diesen mit dem der TCR zu vergleichen. Dies geschah, indem ihre Reaktivität systematisch gegen eine Anzahl von mutierten MHC-Komplexen im ELISA getestet wurde.

Ebenso sollte ein Unterschied in der Bindung zwischen IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifischen Serumantikörpern und den oben beschriebenen kreuzreaktiven Serumantikörpern herausgearbeitet werden.

Material und Methoden

1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien / Verbrauchsmaterialien	Hersteller
30% Acrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
1000 x Leupeptin, 1 mg/ml Stock in H ₂ O	Roche Diagnostics, Mannheim
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
1000 x Pepstatin, 0,7 mg/ml Stock in Methanol	Roche Diagnostics, Mannheim
1000 x Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 200 mM Stock in Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Agar	Gibco, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Hausapotheke, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Biotinyliertes BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Dithiothreitol (DTT) 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt

DNase I	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiaminhydrochlorid (EDTA) 1 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Glucose	DeltaSelect, Pfullingen
Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Glutathion oxidiert	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Hochwald-Nahrungsmittelwerke, Kaiserslautern
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid 0,1%	Sigma-Aldrich, St. Louis; US

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 0,5 mol/l (1N)	Merck, Darmstadt
Streptavidin	IBA, Göttingen
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis; US
TMB Entwickler – TMB Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg; USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane- hydrochlorid (TrisHCl)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris Base)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypton	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
Tween 20	Caelo, Hilden
Urea	Merck, Darmstadt
Yeast Extract	Becton Dickinson and Company, Heidelberg

2 Peptide, Antikörper und Färbereagenzien

Tabelle 2: Verwendete Peptide, Antikörper und Färbereagenzien

Peptid/Antikörper/Färbereagenz	Hersteller
Anti-rabbit IgG HRP	Roth, Karlsruhe
IMP58-66	Intavis Bioanalytical Instruments, Köln
Mouse-anti-HLA-A*0201, Klon BB7.2 (Hybridomüberstand)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Mouse-anti-HLA-A, Klon Tü 155 (Hybridomüberstand)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Mouse-anti-c-myc, Klon 9E10	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/HRP	Dako, Glostrup; Dänemark
Rabbit anti-sheep IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Mouse-anti-human β 2m-Antikörper, HB28 (Hybridomüberstand)	Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg
Polyclonal Rabbit Anti-Human Beta-2- Microglobulin-Antikörper	Dako, Glostrup; Dänemark
Sheep Anti Human IgG1	The Binding Site, Schwetzingen
Sheep Anti Human IgG3	The Binding Site, Schwetzingen
W6/32, Mouse-anti-human HLA-ABC Klasse I Schwerkette/ β 2m-Antikörper	Dako, Glostrup; Dänemark
UV-sensibles Peptid	Intavis Bioanalytical Instruments, Köln

Die Peptidsynthese für den UV-exchange erfolgte in folgendem Institut:

Prof. Stefanovic, Department of Immunology, Tübingen

Tabelle 2.1: Verwendete Peptide im UV-exchange

Nummer	Sequenz	Position	Quelle
1	QLLDGFMITL	38-41	PASD1
2	LLDVPTAAV	27-35	IP-30
3	DLPTQEPAL	140-148	PROS_HUMAN
4	VLFRGGPRGL	12 - 25	SSR alpha
5	ILMEHIHKL	137-145	RL19_HUMAN
6	IISAVVGIL	654-662	ERB2_HUMAN
7	LLDPGEHYC	971-979	OSMR
8	TLPPAWQPFL	5 - 14	Survivin
9	SVYDFVWL	180-188	TRP2
10	DLLRAKLNDV	174-183	MSP1_PLAFD
11	LLGPRLVLA	23-31	TMP21
12	MLERVIKNY	136-144	MAGE-A4
13	ATWDNVGYKL		Unknown
14	RLQGISPKI	103-111	SSX2
15	SLSKILDTV	904-912	NY-Br-1
16	RLAPYPADL	266-274	UL69_HCMVM
17	YLSGANLNL	571-579	CEA
18	SLLQHLIGL	425-433	PRAME

19	LLSHGAVIEV	102-111	NY-Br-1
20	KIIEERDSEL	723-732	SYCP1_HUMAN
21	AIPFHVLYLL		EST
22	ALFDIESKV	711-719	PSMA
23	LAALPHSCL	5 - 13	RGS5_HUMAN
24	ALCNTDSPL	146-154	OFA-iLRP
25	ALQPGTALL	14-22	PSCA
26	KVLEYVIKV	278-286	MAGA1_HUMAN
27	SLSKILDTV	904-912	AN30A_HUMAN
28	ALLSSLNDF		NIF3L1
29	GLGGYMLGSV	109-118	PRIO_THEGE
30	NMLSTVLGV	413-421	RDRP_157AO
31	YVDPVITSI	654-662	MET_HUMAN
32	FLTPKKLQCV	141-150	PSA
33	SLDDYNHLV	288-296	TRP2
34	ALANGIEEV	101-109	APOL3
35	STAPPVHNV	950-958	MUC1_HUMAN
36	STADVIQHC	98-106	NUP188
37	KASEKIFYV	41-49	SSX2
38	GLAAPRLSTL	393-402	VP16_HHV1F

39	LLSAEPVPAA	20-29	CD79B_HUMAN
40	FLLDKKIGV	218-226	CCT2
41	GLMKYIGEV	187-195	TRP-P8
42	LLFNKLNNL	375-383	UL69_HCMVM
43	CLAAGITYV	31-39	Prostein
44	VISNDVCAQV	154-163	PSA
45	KMISAIPTL	11192-11200	MUC16_HUMAN
46	AILALLPAL	105-113	PSCA
47	KLHGVNINV	59-67	RBM4
48	YMNGTMSQV	369-377	Tyrosinase
49	FIAPLGFSL	210-218	UL13_HHV11
50	LLGATCMF	101-109	CCND1_HUMAN
51	FLTPKKLQCV	165-174	KLK3_HUMAN
52	LLFDRPMHV	267-275	HNRPM
53	DVASVIVTKL	241-250	SRP54
54	RLASYLDRV	89-97	Keratin 18
55	YLAPLVAEV	700-708	SCM_DROME
56	SLMAFTAAV	1789-1797	POLG_HCV1
57	ILDKKVEKV	569-577	HSPCB
58	FLATCINGV	1069-1077	POLG_HCVTW

59	RVASPTSGV	1097-1105	IRS2_HUMAN
60	ILHDDEVTV	15-26	RPLP1
61	ALVDHVAEL	306-314	MYO1G
62	LLDQLIEEV	19-27	E1A_ADE05
63	GILGFVFTL	58-66	M1_I33A0
64	ALLNIKVKL	365-373	Keratin 18
65	VLAPRVLRA	21-29	RCN1
66	GLNEEIARV	330-338	KNTC2
67	VLHDDLLEA	385-393	HA-1
68	FLDPRPLTV	190-198	CYB1B1
69	AAGAVVGGL	99-107	NU6M_SYNAN
70	ILHNGAYSL	435-443	ERB2_HUMAN
71	RMFPNAPYL	126-134	WT1
72	LLYGGVPTV		Unbekannt
73	SLLPPDALVGL	156-166	SEC23B
74	LMISRTPEV	94-102	IGHG3_HUMAN
75	QLEELEDEL	1540-1548	MYH9_HUMAN
76	NIRGFIAPL	206-214	UL13_HHV11
77	SLPKKLALL		HSPCO23
78	KLQCVDLHV	146-154	PSA

79	KLFGSGTTYL	125-134	TVC_HUMAN
80	AIVDKVPSV	147-155	LOC51137
81	QLVDIIEKV	114-122	PSME3
82	GIRTVLQNL		Unknown
83	LLHETDSAV	4 - 12	PSMA
84	TLYEAVREV		RPL10A
85	ALAQRLLLEV	457-465	C14or49
86	HTANIQTLI	313-321	CASC5_HUMAN
87	NLLPKLHIV	179-187	CLIC1
88	SVASTITGV	129-137	Adipophilin
89	STSCYSLDV		Unknown
90	GLQPEQQLQL	45-54	NMV_HUMAN
91	TIIDLPGITRV		MX2
92	YIVPCLHEV		EGLN3
93	ALQLLLEV	92-99	NEP_I02A7
94	SLLPAIVEL	403-411	PP2R1A
95	VIIRNSLAV		Unknown
96	GLVPFLVSV	377-385	KONA2
97	VLQNLQRPV		Unknown
98	KLATNAAVTV	509-518	KIAA0002

99	TLDSQVMSL	360-368	TRP2
100	KIFGSLAFL	369-377	ERB2_HUMAN
101	SVIIRNSLAV		Unknown
102	LLISFLIFL	227-235	PRIO_THEGE
103	ELTLGEFLKL	95-104	Survivin
104	SVFAGVVG	581-589	GUCY1A3
105	LAARAIVAI	60-68	RSP4_HUMAN ("OFA-1")
106	KLLEPVLLL	50-58	RPS16
107	KLFDDKLQNC	138-147	OSBPL9
108	RLQGISPKI	135-143	M40
109	TVSTVGISII	667-676	VPR-binding protein
110	QLQEGKNVIGL		TAGLN2
111	VMDSKIVQV	432-440	KPNA6
112	ILFSSPPVI	235-243	PRIO_CANFA
113	SVFAGVVG	581-589	GCYA3_HUMAN
114	GVLVGVALI	694-702	CEA
115	SLLGGDVVSV	27-36	DSIPI
116	ALLELAEEL	110-118	KIAA0002
117	TLQAHMEDL		Axotrophin
118	FLGENISNFL	242-251	APOL-1

119	FLDPIKAYL	76-84	GPR116
120	LLYLNKQVTV	315-324	UL87_HHV6U
121	ALDVYNGLL	299-307	PPAP_HUMAN
122	VLQELNVTV	169-177	Proteinase 3
123	LLAAWTARA	9 - 17	amyloid beta precursor protein
124	FLHDISDVQL	207-216	LASS1_HUMAN
125	FANERCLQL		FLJ20364
126	YLNNQVVFVSL	1779-1788	TEM4
127	FLDGNEMTL	178-186	CLIC4
128	QLIDKVVWQL	593-601	SEC14L1
129	QVCAIHERV	478-486	EIF3S8
130	YLIPLLERL	150-158	DDX6_HUMAN
131	HLPETKFSEL	942-951	AIM1
132	LLDVPTAAV	27-35	IFI30
133	FLGENISNFL	242-251	APOL1_HUMAN
134	YLDNGVVFV	316-324	DDB1
135	ALFGALFLA	2 - 10	PLTP_HUMAN
136	GAFEHLPSL	107-115	5T4
137	ALDDFDLDML	438-447	VP16_HHV1F
138	ALSDHHIYL	216-224	ALDOA

139	YLWTSAKNTL	838-847	SYCP1_HUMAN
140	SMELPSFGV	506-514	RDRP_I01A1
141	LLEDLIRC	1176-1184	TNRC11
142	YIGEVLSV		HA-2
143	ALSAYDLVL	227-235	guanine nucleotide binding protein
144	ALSNLEVKL	326-334	URP2_HUMAN
145	SLLMWITQC	157-165	NY-ESO-1
146	KLQCVDLHV	146-154	KLK3_HUMAN
147	SLAGGIIGV	154-162	HNRPK_BOVIN
148	AAGIGILTVI	27-36	Melan A
149	AAGIGILTV	27-35	Melan A
150	ALFDGDPHL	1 - 9	KIAA0367
151	ALADGVQKV	176-184	APOL1_HUMAN
152	ALAAVVTEV		frameshift, DDX3 reading frame +2
153	SIHHGVVEV	730-738	A4_HUMAN
154	HIGSWILVL	5 - 13	PRIO_CANFA
155	TMAWTVVNSI	85-94	PAX_I96A3
156	TLWVDPYEV	103-111	BTG1
157	RLLDYVVNI	679-687	FLJ20004
158	VLATLVLLL	72-80	EST

P1	YVLDHLIVV	109 - 117	BRLF1_EBVB9
P2	CLGGLLTMV	426 - 434	LMP2_EBV
P3	FLYALALLL	356 - 364	LMP2_EBV
P4	YLLEMLWRL	125 - 133	LMP1_EBVB9
P5	GLCTLVAML	259 - 267	IE63_EBV
P6	NLVPMVATV	495 - 503	pp65_HCMVA
P7	VLEETSVML	316 - 324	VIE1_HCMVT
P8	LLDFVRFMGV	284 - 293	EBNA6_EBV

3 Sonstiges

Humane Seren:

- S22: IgG3, kreuzreaktiv
- F105: IgG3, kreuzreaktiv
- B175: IgG1, kreuzreaktiv
- 201M: IgG1, kreuzreaktiv
- WK: IgG1, nicht kreuzreaktiv
- K321: IgG1, nicht kreuzreaktiv
- V19.0: IgG1, nicht kreuzreaktiv
- HS26045: IgG1, nicht kreuzreaktiv

Bakterien:

- BL21 (DE3) E.coli, Onkologisches Labor, Uniklinik des Saarlandes, Homburg

Vektoren:

- pET-HLA-A*0201 wt/mut (Ampicillin-Resistenz), Novagen, Darmstadt

In den Vektoren waren folgende Mutationen vorhanden:

Tabelle 3: Eingebachte Mutationen

α 1-Helix	α 2-Helix
Glu55Ala	Trp107Ala
Glu58Ala	Ala150Gly
Asp61Ala	Gln155Ala
Arg65Ala	Ala158Gly
Lys66Ala	Thr163Ala
Gln72Ala	Glu166Ala
Val76Ala	Trp167Ala
	Arg169Ala
	Arg170Ala
	Glu173Ala
	Trp174Ala

- pBirAcm (Chloramphenicol-Resistenz), Avidity, Colorado; US
- pHN1- β 2m, Ludwig Institute for Cancer Research, Épalinges; Schweiz

4 Geräte und Software

Herstellung löslicher MHC-Peptid-Komplexe:

- Inkubationsschüttler, Infors AG, Bottmingen
- Zentrifuge, Hermle Labortechnik, Wehingen

- Magnetrührer, Heidolph Instruments, Schwabach
- Ultraschallgerät BRANSON SONIFIER II, G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd
- Vakuumfiltrationseinheit, VWR, Darmstadt
- Amicon-Rührzelle, Merck-Millipore, Darmstadt
- Ultracel 30 kDa Ultrafiltrations-Membranscheiben, Merck-Millipore, Darmstadt
- Microsep-Säule, MicrosepTM advance centrifugal device, Pall, Dreieich
- Superdex75 10/300 GL, Amersham BioSciences, Little Chalfont; UK
- ÄKTA Prime FPLC System, Amersham BioSciences, Little Chalfont; UK

Konzentrationsbestimmung und Aliquotieren der MHC-Peptid-Komplexe:

- GeneQuantTM pro RNA/DNA Calculator; Amersham BioSciences, Little Chalfont; UK

Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE:

- Elektrophoresekammer, Bio-Rad Laboratories, Hercules; USA

UV-mediated ligand exchange:

- 96-well Polypropylenplatte, VWR, Darmstadt
- UV-Lampe, Wellenlänge 365 nm, Benda Laborbedarf, Wiesloch

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA):

- Nunc-Immuno MicroWell 96 well solid plates MaxiSorp, Sigma-Aldrich, St. Louis; US
- Fluorometer, Wallac Victor 2 (1420 Multichannel Counter), Pekin Elmer, Freiburg

5 Puffer und Lösungen

Für die Experimente wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

1x PBS:

- 1,42 g Na₂HPO₄

- 0,22 g KH_2P_04
- 8,75 g NaCl
- bis 1 Liter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auffüllen (pH 7,4-7,6)

10x Lämmli-Laufpuffer:

- 144 g Glycin
- 30,34 g Tris Base
- 10 g SDS
- bis 1 Liter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auffüllen (pH 8,3)

12% SDS-Polyagrylamid-Gel (Ansatz für 10 ml):

- 3,3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- 4 ml 30% Acrylamid-Mix
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,1 ml 10% APS
- 0,004 ml TEMED

15% SDS-Polyagrylamid-Gel (Ansatz für 10 ml):

- 4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
- 3,3 ml 30% Acrylamid-Mix
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,1 ml 10% APS
- 0,004 ml TEMED

Stack-Gel (Ansatz für 2 ml):

- 1,4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

- 0,33 ml 30% Acrylamid-Mix
- 0,25 ml 1 M Tris (pH 6,8)
- 0,02 ml 10% SDS
- 0,02 ml 10% APS
- 0,002 ml TEMED

5x SDS-Laufpuffer:

- 0,6 ml 1 M Tris (pH 6,8)
- 3 ml 85% Glycerol
- 2 ml 10% SDS
- 10 ml Bromphenolblau
- 4,4 ml H₂O_{dest.}
- für reduzierenden Laufpuffer: 5% β-Mercaptoethanol zugeben

Coomassie-Färbelösung:

- 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R250
- 400 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 500 ml H₂O_{dest.}

Coomassie-Entfärber:

- 100 ml Methanol
- 100 ml Essigsäure
- 800 ml H₂O_{dest.}

Gel-Trocknungs-Puffer:

- 10% Glycerin
- 20% Methanol

Urea-Lösung:

- 25 mM MES (pH 6,0)
- 8 M Urea
- 10 mM EDTA
- kurz vor Gebrauch 0,1 mM DDT hinzufügen

TBS-Puffer:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 3 g Tris Base
- bis 1 Liter mit H₂O_{dest.} Auffüllen

Injection-Puffer:

- 3 M Guanidin-HCL
- 10 mM Natriumacetat
- 10 mM EDTA
- mit konzentrierter Salzsäure pH 4,2 einstellen

Faltungspuffer:

- 100 mM Tris Base
- 0,4 M L-Arginin
- 2 mM EDTA
- mit konzentrierter Salzsäure pH 8,0 einstellen

Resuspensionspuffer:

- 50 mM TrisHCl (pH 8,0)
- 25% Sucrose
- 1 mM EDTA

- 0,1% Natriumacetat
- kurz vor Gebrauch 10 mM DTT hinzufügen

Inclusion body Waschpuffer:

- 50 mM TrisHCl (pH 8,0)
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- Natriumazid 0,1%
- für Puffer mit Triton X-100: 0,5% Triton X-100 hinzufügen
- kurz vor Gebrauch 1 mM DTT hinzufügen

LB-Medium/Platte:

- 10 g Trypton
- 5 g Yeast Extract
- 10 g NaCl
- 15 g Agar (für Platte)
- bis 1 Liter mit H₂O_{dest.} auffüllen
- 100 µg/ml Ampicillin
- 25 µg/ml Chloramphenicol

6 Herstellung löslicher MHC-Peptid-Komplexe

(Altman und Davis, 2003)

6.1 Transformation und Induktion der Bakterien, In-vivo-Biotinylierung und Expression der löslichen schweren und leichten Kette

Diese Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von Gabi Carbon vor Beginn meiner Tätigkeit durchgeführt.

Hierbei wurden Escherichia coli (BL21-DE3) mit einem pET-HLA-A*0201wt/mut- und einem pBIRAcM-Vektor cotransformiert. Der pET-HLA-A*0201wt/mut-Vektor codiert die Aminosäuren 1-

280 der schweren Kette entweder als Wildtyp oder mit der gewünschten Mutation sowie die Sequenz eines BirA-Substrat-Peptides (BSP), eine Biotin-Akzeptor Domäne. Der pBIRAcM-Vektor enthält die genetische Information für eine Biotin-Ligase (BirA), welche die Entstehung einer Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Biotins und der ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes des BSP katalysiert. Es existiert zwar auch eine endogene BirA-Expression in den Bakterien, doch diese würde für eine effiziente Biotinylierung aller gebildeten schweren Ketten nicht ausreichen. (Leisner et al., 2008)

Vorgeschaltet sind in beiden Plasmiden regulatorische Gene, Promotor und Operatoren des Lac-Operons, mit dessen Hilfe sich die Expression der Gene steuern lässt. Analog zum pET-HLA-A*0201wt/mut-Vektor konnte auch der pHN1- β 2m-Vektor für die leichte Kette verwendet werden, welcher jedoch nicht mit dem pBIRAcM-Vektor cotransformiert werden musste. In den Plasmiden für die schwere Kette oder das β 2-Mikroglobulin war zusätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen vorhanden. Der pBIRAcM-Vektor war mit einem Chloramphenicol-Resistenzgen kombiniert.

Um rekombinante Bakterien zu erhalten wurden zu den E. coli (BL21-DE3) jeweils 10 ng des pET-A*0201-Vektors und 10 ng des pBIRAcM-Vektors hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Es folgten 45 Sekunden bei 42°C (Hitzeschock) und schließlich eine Stunde Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Bakterien wurden danach auf einer selektiven LB-Platte (100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und im Brutschrank über Nacht heranwachsen gelassen. Es konnten so nur Bakterien überleben, die beide Resistenzgene bzw. beide Vektoren besaßen. Von diesen wurde eine Kolonie gepickt und in 50 ml selektivem LB-Medium über Nacht bei 37°C und 170 U/min inkubiert. Am nächsten Morgen wurde diese Kultur in 1 Liter selektivem LB-Medium 1:50 verdünnt und bei 37°C und 270 U/min zu einer OD₆₀₀ von 0,6 hochwachsen gelassen. Anschließend wurden 100 mg/l Biotin und IPTG in einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt und die Bakterien vermehrten sich für weitere 3-4 Stunden bei 37°C und 270 U/min.

IPTG ist ein Thiogalaktosid, welches als Induktor des Lactose-Operons dient, indem es den Repressor LacI inhibiert (Marbach und Bettenbrock, 2002). Biotin wurde zum Zwecke der In-vivo-Biotinylierung hinzugefügt. So kam es folglich zur Produktion von an der Biotin-Akzeptor-Domäne biotinylierten schweren Ketten, die als inclusion bodies ins Periplasma der Bakterienzelle sekretiert wurden. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension in einem sterilen 500 ml Gefäß 15 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Pellet wurde über Nacht bei -70°C weggefroren. Durch die Kälte wurde die Zellmembran brüchig, was die Aufreinigung der inclusion bodies im nächsten Schritt erleichterte.

6.2 Aufreinigung der inclusion bodies

Inclusion bodies sind sogenannte Einschlusskörperchen in der Bakterienzelle, die durch die Anreicherung einer großen Menge an produziertem Protein entstehen (Williams et al., 1982). Um die

reine leichte oder schwere Kette des HLA zu erhalten, müssen diese vom Rest der Zellbestandteile getrennt und die Proteinaggregate mit Hilfe von Harnstoff löslich gemacht werden.

Das gefrorene Bakterienpellet wurde langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und in 25 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Dies wurde in einen Polypropylen-Becher mit einem Magnetrührer überführt. Unter Rühren erfolgte die Hinzugabe von 1 mg/ml Lysozym, 5 mM MgCl₂, 33,33 µg/ml DNase I, 1% Triton X-100 und 10 mM DTT.

Die meisten Bakterien werden durch die Zugabe von Triton X-100 lysiert. Durch die so freiwerdende chromosomale DNA erhöht sich die Viskosität. Dieser Effekt nimmt jedoch durch den Verdau mittels DNase wieder ab.

Nach 15-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde der Becher in ein größeres Gefäß mit Eis gestellt. Dies diente dazu, die Bakterienlösung während der folgenden Ultraschallbehandlung vor Überwärmung zu schützen. Durch den Ultraschall wurden die restlichen Bakterien lysiert und die DNA zerkleinert.

Der Becher wurde so eingebracht, dass die Spitze des Ultraschallgerätes den Boden gerade nicht berührte. Schließlich erfolgte 12 Mal für 3 bis 5 Sekunden bei einer Intensität von 35% die Abgabe eines Ultraschallsignals.

Das Lysat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert.

Die inclusion bodies haben in der Regel eine höhere Dichte als die restlichen Zellbestandteile und lassen sich so gut von diesen trennen.

So entstand ein Pellet mit einem inneren weißen Kern, der gewöhnlich die produzierte schwere Kette des HLA oder das β₂-Mikroglubulin enthielt und einem äußeren dunklen Ring mit Zelldetritus, der aber während der nächsten Schritte verschwand.

Vom Überstand wurden 50 µl abgenommen, mit S1 gekennzeichnet und bei -20°C weggefroren, um diesen evtl. später mittels SDS-Gelelektrophorese zu analysieren. Der restliche Überstand wurde verworfen.

Nach Resuspension des verbliebenen Pellets mit 1-2 ml Waschpuffer, wurde mit diesem wieder auf 20 ml aufgefüllt und die Ultraschallbehandlung wie oben beschrieben wiederholt. Danach wurde nochmals zentrifugiert und 50 µl Überstand als S2 markiert aufgehoben.

Diese Schritte wurden dann mindestens 3 Mal wiederholt und S3-S5 abgenommen. Der letzte Schritt wurde mit Waschpuffer ohne Triton X-100 durchgeführt, um das Detergens vom Protein zu trennen. Nach Ultraschallbehandlung, Zentrifugation und Abschütten des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets mit 200 µl ddH₂O. Dies wurde dann in 4-8 ml Urea-Lösung aufgenommen bis alle Proteine

in Lösung gegangen waren und die Trübung verschwand. Die Menge der Urea-Lösung ist abhängig von der Menge an produziertem Protein.

Anschließend wurde bei 20000 U/min für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes 15 ml-Röhrchen überführt. Die Konzentration der erhaltenen schweren bzw. leichten Kette wurde mittels einer Extinktionsmessung (s.u.) einer 1:50-Verdünnung (2 µl Probe und 98 µl Urea-Lösung) bei 240-320 nm abgeschätzt. In einem 12%-igen SDS-Gel wurde die Probe unter reduzierenden Bedingungen kontrolliert. Zum Schluss wurden Aliquots mit 8 mg der schweren Kette und 7 mg des β 2-Mikroglobulins mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

6.3 Gel Shift Assay

Zur Kontrolle ob eine effiziente Biotinylierung des BSP an der schweren Kette stattfand, wurde ein Gel Shift Assay durchgeführt. Eine Probe der schweren Kette wurde für 20 Minuten mit Streptavidin im Überschuss inkubiert. Anschließend mit einer Probe ohne Streptavidin zum Vergleich in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie blue gefärbt (siehe 8. Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE). Streptavidin interagiert mit der biotinylierten schweren Kette und verlagert die normalerweise bei 36 kDa sichtbare Bande nach oben, sodass sie bei ca. 100 kDa zu liegen kommt (Leisner et al., 2008). Die Menge an biotinylierter schwerer Kette konnte durch das Verhältnis der Intensität der Bande mit Streptavidin zu der Bande ohne Streptavidin abgeschätzt werden.

6.4 Faltung der MHC-Peptid-Komplexe

1. Tag: Beginn der Faltung

Zu 250 ml vorgekühltem Faltungs-Puffer wurden unter Rühren 385 mg reduziertes Glutathion (Endkonzentration 5 mM), 77,5 mg oxidiertes Glutathion (Endkonzentration 0,5 mM) und 250 µl PMSF (Endkonzentration 0,2 mM) hinzugefügt. Weiterhin wurden 3 mg IMP-Peptid abgewogen, mit DMSO zu einer Konzentration von 10 mg/ml verdünnt und ebenfalls tropfenweise zugegeben. Ein 8 mg-Alliquot (entspricht 210 nM) der gewünschten schweren Kette wurde mit 8 M Urea zu einer Lösung mit 20 mg/ml verdünnt und mit 700 µl Injecton-Puffer gemischt. Zu einem 7 mg-Alliquot (entspricht 583 nM) des β 2-Mikroglobulin wurden 780 µl Injection-Puffer hinzugefügt. Beide wurden in jeweils eine 26G-Nadel aufgezogen und in den Faltungs-Puffer injiziert. Dies erfolgte so, dass man mit Hilfe des Magnetrührers einen Strudel im Becher erzeugte und zuerst das β 2-Mikroglobulin und danach die schwere Kette schnell tief in den Strudel einspritzte. Dies sollte eine gute Lösung der Proteine fördern und eine Aggregation von ungefaltetem Protein an Stellen mit hoher Konzentration vermeiden.

Das Gemisch konnte nun zur Inkubation über 12 bis 24 Stunden in den Kühlraum mit 4°C auf eine Magnetührplatte gestellt werden.

2. Tag: Hinzufügen der schweren Kette

Ein weiteres 8 mg-Alliquot der schweren Kette wurde wie oben beschrieben verdünnt, Injection-Puffer hinzugefügt und mit der Nadel injiziert. Das Gleiche erfolgte 12 Stunden später nochmals, sodass insgesamt drei Aliquots der schweren Kette hinzugefügt wurden. Diese Schritte konnten auch länger auseinandergezogen werden und zum Beispiel ohne negative Auswirkungen an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt werden. Das verzögerte Einbringen der H-Kette ermöglichte den Erhalt einer größeren Menge an gefaltetem Protein pro Volumen. Eine weitere Inkubation von mindestens 12 Stunden folgte.

3. Tag: Einengen und Beginn einer zweiten Faltung

Die gefalteten Komplexe wurden zuerst mittels eines Faltenfilters in ein autoklaviertes Gefäß abfiltriert. Dies diente dazu, die groben Aggregate von ungefaltetem Protein zu entfernen. Schließlich erfolgte die Sterilfiltration mit einem Vakuumfilter. Die 250 ml sollten nun auf ca. 25 ml einkonzentriert werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer Amicon-Rührzelle, in die eine Biomax-30-Membran eingelegt wurde. Da die gefalteten Komplexe ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa besitzen, können sie die Membran nicht durchdringen. Die löslichen ungefalteten Proteine werden zum größten Teil abfiltriert.

Die Rührzelle wurde anfangs mit 200 ml ddH₂O und einem Druck von 4 bar durchgespült. Danach wurden die 250 ml mit den gefalteten pMHC-Komplexen eingefüllt und ebenfalls mit 4 bar auf 20 ml eingengt. Der Durchfluss wurde auf Eis gesammelt. Die konzentrierten Komplexe wurden in ein neues Gefäß überführt. Es erfolgte die Spülung der Rührzelle mit 5 ml Durchfluss, um auch die noch auf der Membran haftenden Komplexe zu erhalten. Schließlich konnten 25 ml pMHC-Komplexe erhalten und kühl gelagert werden. Die Rührzelle wurde wieder mit ddH₂O durchgespült und die Membran in 70% Ethanol für die nächste Konzentrierung dieses Komplexes aufbewahrt.

Der Durchfluss konnte zu einer weiteren Faltung verwendet werden. Es erfolgte wie zu Beginn einer neuen Faltung die Hinzugabe von PMSF, leichter und schwerer Kette und die weitere Inkubation bei 4°C für 12 bis 24 Stunden.

4. Tag: Hinzufügen der schweren Kette

Auch hier wurde im Abstand von ca. 12 Stunden noch zweimal die schwere Kette hinzugefügt.

5. Tag: Zweites Einengen des Komplexes

Zunächst wurde genauso wie an Tag 3 vorgegangen. Folglich erhielt man zwei Gefäße mit 25 ml gefalteten pMHC-Komplexen (von Tag 3 und Tag 5). Diese wurden mit 3200 g bei 10°C für 5 Minuten abzentrifugiert, um unlösliche Aggregate zu entfernen. Anschließend sollten die Komplexe nun noch weiter eingengt werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer Microsep-Säule, welche kontinuierlich mit 5 ml gefüllt und 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde verworfen bis schließlich noch

2 ml konzentrierte Komplexe vorhanden waren. Welche nun mittels FPLC aufgereinigt werden konnten.

6. Tag: Fast protein liquid chromatographie (FPLC)

Um die richtig gefalteten pMHC-Komplexe zu reinigen wurde freundlicherweise von der Mitarbeiterin Natalie Fadle eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt.

Der Faltungspuffer musste hierzu gegen TBS ausgetauscht werden. Es wurden 1 ml der Komplexe mit TBS auf 5 ml aufgefüllt und ein erneutes Einengen bis auf 1 ml durchgeführt. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, um das Medium komplett auszutauschen. Anschließend wurden die konzentrierten Komplexe auf eine Superdex75-Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit TBS-Puffer bei einer Flussrate von 0,2 ml pro Minute und Raumtemperatur darüber eluiert. Es wurden Fraktionen von 10 ml gesammelt und man erhielt meist drei Aktivitätspeaks, von denen der zweite dem richtig gefalteten MHC-Peptid-Komplex entsprach.

7 Konzentrationsbestimmung und Aliquotieren der pMHC-Komplexe

Die Konzentration der gereinigten pMHC-Komplexe wurde mit Hilfe einer Extinktionsmessung bei 280 nm ermittelt. Dazu wurde das Photometer zuvor mit 100 µl TBS kalibriert und danach die UV-Absorption einer 1:50-Verdünnung der Probe (2 µl Probe und 98 µl TBS) gemessen. Dieses Verfahren beruht bei Proteinen vor allem auf ihrem Gehalt an Tyrosin-, Tryptophan- und Cystein-Resten, welche das UV-Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren (Gill und von Hippel, 1989).

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c[\text{mg/ml}] = \text{OD}_{280} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bevor die Komplexe in Aliquots mit 13-14 µg Protein aufgeteilt wurden, mussten noch die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Pepstatin und PMSF in einem Verhältnis 1:1000 hinzugegeben werden. Daraufhin wurden sie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

8 Auftrennen von Proteinen mittels SDS-PAGE

Um sicher zu gehen, dass es sich bei der Fraktion, die zur Zeit des zweiten Aktivitätspeaks gesammelt wurde, um die richtig gefalteten pMHC-Komplexe handelte, kontrollierte man diese vor Aliquotierung mittels SDS-PAGE.

Dies ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld (Laemmli, 1970).

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist in der SDS-Gelelektrophorese nur von der Masse des Proteins abhängig. Die Eigenladung wird durch das zugegebene anionische Detergenz SDS überdeckt. Dieses bindet proportional zum Molekulargewicht an die durch Hitze denaturierten

Polypeptide und verleiht allen eine negative Ladung. Pro Gramm Protein binden ca. 1,4 g SDS. SDS löst außerdem Sulfhydryl-Bindungen innerhalb der Polypeptidketten und zerstört so zusätzlich Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine. Hinzugegebene reduzierende Agenzien, wie z.B. β -Mercaptoethanol, lösen Disulfidbrücken in Proteinen, entfalten diese so oder trennen oligomere Proteine in ihre Untereinheiten. Die entstandenen SDS-Polypeptid-Komplexe wandern bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von ihrer Größe, wobei kleine Moleküle schneller und große Moleküle langsamer wandern. (Saphiro et al., 1967)

Um eine größere Trennschärfe der Banden zu erreichen werden diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet. Beide Gele unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration und ihrem pH-Wert. Im Sammelgel werden die Polypeptide durch Anschließen eines elektrischen Feldes lokal fokussiert und anschließend im Trenngel nach ihrer Masse getrennt.

Zur Durchführung wurden nach Standardprotokollen 15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die Pufferkammern mit Tris-Laufpuffer (Laemmli-Puffer) gefüllt. Zu 3-4 μ g der pMHC-Komplexe wurden 5 μ l 5xProbenpuffer hinzugefügt und mit TBS auf 20 μ l aufgefüllt. Dies wurde dann vorsichtig in die Geltaschen pipettiert.

Die Elektrophorese wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. So konnten zwei Banden erhalten werden, da leichte und schwere Kette nichtkovalent miteinander verbunden sind. (Garboczi et al., 1992)

Zusätzlich wurde eine Tasche mit 3 μ l Marker beladen. Die Elektrophorese wurde dann bei 150 Volt für ungefähr eine Stunde durchgeführt. Sie wurde gestoppt sobald sich die Bromphenolblaufront ca. 0,5 cm vor dem unteren Gelrand befand.

Das entnommene Gel konnte dann mit der Coomassie-Färbelösung angefärbt werden. Hierzu wurde es aus der Apparatur entnommen und mindestens eine halbe Stunde oder über Nacht in der Lösung geschwenkt. Das enthaltene Methanol und die Essigsäure fixieren hierbei die Proteine im Gel, während der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue sie sichtbar macht. Zum Entfärben wurde das Gel in einer Entfärbelösung geschwenkt, bis die Banden deutlich zu erkennen waren.

9 UV-mediated ligand exchange

(Rodenko et al., 2006)

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten die verwendeten Serumantikörper näher charakterisiert werden. Hierbei wurden wie oben beschrieben HLA-A*0201-Moleküle gefaltet, welche anstatt des IMP₅₈₋₆₆ ein UV-sensibles Peptid in ihrer Bindungstasche besaßen. Dieses Peptid enthält eine synthetische Aminosäure mit einer (2-nitro)phenyl-Seitenkette, wodurch es lichtempfindlich wird. Durch UV-Licht mit einer Wellenlänge > 350 nm kann es gespalten werden und dissoziiert aus der Bindungstasche. Der

entstandene leere MHC-Komplex hätte so keine lange Halbwertszeit und würde ebenfalls zerfallen, da die gebundenen Peptide für die Stabilität der Komplexe verantwortlich sind. Dies kann jedoch verhindert werden, indem ein Überschuss an anderen bindungsfähigen Peptiden hinzugegeben wird. Das gewünschte Peptid setzt sich in die freie Bindungstasche und stabilisiert so den Komplex.

Auf diese Art und Weise konnten 166 neue MHC-Peptid-Komplexe erzeugt werden, auf die die Seren getestet werden konnten. Die MHC-UVsens.-Komplexe wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll gefaltet. Aufgrund des verwendeten lichtempfindlichen Peptides mussten alle Faltungsschritte im Dunkeln durchgeführt werden. Die erhaltenen Komplexe wurden dann mit PBS zu einer Konzentration von 250 µg/ml (5 µM) verdünnt. Die gewünschten Peptide wurden auf Raumtemperatur gebracht und mit DMSO auf 1 mg/ml eingestellt. Mit PBS wurden diese dann auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml (500 µM) weiter verdünnt und vollständig darin gelöst. Die Exchange-Reaktion fand auf einer 96-Well Polypropylenplatte statt. Hierzu wurden 100 µl PBS mit 12,5 µl der Peptidlösung in jedes Loch pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten auf einem Schüttler vorinkubiert. Anschließend wurden 12,5 µl der MHC-UVsens.-Komplexe hinzugegeben, sodass diese in einer Endkonzentration von 25 µg/ml vorlagen. Mit einer UV-Lampe der Wellenlänge 365 nm wurde die Platte dann bis zu einer Stunde bei einem Abstand von 5 cm bestrahlt. Die neu entstandenen MHC-Peptid-Komplexe konnten dann für einen ELISA genutzt und die Bindung der Seren überprüft werden. Dieser wurde wie in Abschnitt 10. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) beschrieben durchgeführt. Lediglich wurden keine Verdünnungsreihen der Seren angefertigt, sondern immer mit einer 1:100-Verdünnung gearbeitet.

10 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Bindung der Serum- und Kontroll-Antikörper am pMHC-Komplex wurde mittels ELISA überprüft. Dies ist eine Methode bei der Antigene fest an eine Mikrotiterplatte (96 Wells) gebunden und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden (Engvall und Perlmann, 1972). Von einem „Sandwich-ELISA“ wird gesprochen, wenn zuerst ein Antikörper, dann ein Antigen und wieder ein Antikörper auf die Platte gegeben werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion kann anschließend mit einem Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt, meist Peroxidase, welches eine Farbreaktion auslöst. Zur Quantifizierung der Reaktion wird das chromogene Substrat photometrisch bei 450 nm im ELISA-Reader vermessen.

10.1 Quantifizierung der Bindung der Serumantikörper an den mutierten MHC-Peptid-Komplexen

Der ELISA wurde meist über zwei Tage durchgeführt. Am ersten Tag wurde eine Nunc-Maxisorb-Platte mit dem pMHC-Komplexen gecoatet. Dazu wurden in jedes Loch 100 µl biotinyliertes BSA gelöst in PBS in einer Konzentration von 2 µg/ml gegeben und bei 37°C eine Stunde stehen gelassen. Danach

wurde drei Mal mit PBS gewaschen und 100 µl Streptavidin gelöst in PBS in einer Konzentration von 1 µg/ml hinzugefügt. Dies wurde dann eine bis drei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Je 100 µl der pMHC-Komplexe in einer Konzentration von 5 µg/ml konnten dann in jedes Loch pipettiert werden. In eine Reihe wurden nur 0,5 µg/ml des pMHC-Komplexes aufgetragen, welche später zur Kontrolle mit dem mAb Tü 155 verwendet werden sollte.

Dieser ist ein monoklonaler Antikörper spezifisch gegen HLA-A-Moleküle (Hutter et al., 1996). Er bindet außerdem nur wenn ein Peptid in der Bindungstasche vorhanden ist und diente als Positivkontrolle. Die pMHC-Komplexe wurden dann über Nacht bei 4°C an Streptavidin gebunden. Dies bewirkt, dass die biotinylierten pMHC-Komplexe ihre korrekte Faltung behalten und richtig ausgerichtet sind. (Chames et al., 2000)

Am zweiten Tag wurde die Platte wieder drei Mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend mit 150 µl 2%iger Magermilch in PBS-Tween 20 für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Alle Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt und nach jedem Schritt wurde 3 bis 4 Mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Es wurden dann Verdünnungsreihen der Seren von 1:25 bis 1:6400 in 2%MM/PBS-Tween 20 angefertigt und jeweils 100 µl in die Wells gegeben. Bei Serum S22 wurde zwei Verdünnungstufen höher begonnen, da es von allen Seren die stärkste Bindung aufweist und so besser vergleichbar blieb. Eine Inkubation von einer Stunde und ein Waschschrift folgten bevor die sekundären Antikörper hinzugefügt wurden. Als solche dienten 100 µl der 1:4000 verdünnten Sheep Anti Human IgG1- oder Sheep Anti Human IgG3-Antikörper, je nachdem welche Subklasse im Serum vorlag. Bei der Kontrollreihe erfolgte die Hinzugabe des mAb Tü 155 in einer 1:50 Verdünnung. Eine weitere einstündige Inkubation und ein Waschschrift wurden durchgeführt. Zur Detektion der sekundären Antikörper wurde ein HRP-konjugierter anti-sheep-Antikörper 1:4000 verdünnt in 2%MM/PBS-Tween 20 und zur Detektion des Tü 155 ein HRP-konjugierter anti-mouse-Antikörper 1:2500 verdünnt verwendet. Nach einer weiteren Stunde Inkubation und einem letzten Waschschrift konnte der ELISA über eine Farbreaktion entwickelt werden. Dazu wurde ein TMB-Peroxidase Kit verwendet. Die Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Von der entstandenen Lösung pipettierte man jeweils 100 µl in die Löcher. Dies führte zu einer Blaufärbung der Positivkontrollen. Bevor eine Reaktion in den Negativkontrollen sichtbar werden konnte, wurde das Ganze mit 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Well gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau zu gelb führte.

Die Intensität des Farbtönen konnte mittels ELISA-Reader durch die Absorption bei 450 nm quantifiziert werden.

10.2 Kontroll-ELISA

Zur Kontrolle der richtigen Faltung, der Beladung mit einem Peptid und der richtigen Ausrichtung auf der Platte wurde ein zusätzlicher ELISA mit spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Hierzu wurde die 96-Well-Platte wie oben beschrieben am Tag zuvor mit 5 µg/ml pMHC-Komplex gecoatet und am Folgetag mit 2%MM/PBS-Tween 20 geblockt. Statt der Serumverdünnungen erfolgte die Hinzugabe der Kontroll-Antikörper. Hierzu wurden die von der Maus stammenden Antikörper W6/32, HB28 und BB7.2 und ein Kaninchen-Antikörper gegen menschliches β 2-Mikroglobulin verwendet. Der mAb W6/32 wurde in einer 1:2500 Verdünnung verwendet und reagiert mit monomorphen Abschnitten im Molekül, die allen HLA Klasse I - Komplexen (HLA-A, B und C) gemeinsam sind (Barnstable et al., 1978). Der mAb BB7.2 ist in niedrigen Konzentrationen spezifisch gegen HLA-A*02 und HLA-A*69, zeigt in höheren Konzentrationen aber auch Kreuzreaktionen mit anderen Subtypen (Hilton und Parham, 2013). Er wurde in einer 1:100 Verdünnung auf die pMHC-Komplexe gegeben. Die beiden anderen mAb waren gegen die leichte Kette, das β 2-Mikroglobulin, gerichtet (Pokrass et al., 2013). Der mAb HB28 wurde 1:100 in 2%MM/PBS-Tween 20 verdünnt, der rabbit anti-human β 2-Mikroglobulin-Antikörper 1:20000. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und einem Waschschrift konnten die sekundären HRP-konjugierten anti-mouse- oder anti-rabbit IgG-Antikörper hinzugefügt werden. Wobei der anti-mouse/HRP-Antikörper wie oben beschrieben und der anti-rabbit IgG-HRP-Antikörper in einer 1:7500 Verdünnung Verwendung fanden. Nach Inkubation und Waschen konnte nun wieder mit Hilfe des TMB-Peroxidase Kits entwickelt und mittels ELISA-Reader ausgewertet werden.

Ergebnisse

1 Herstellung der mutierten HLA-A*0201-IMP-Komplexe

Zu Beginn der Arbeit mussten die mutagenisierten Varianten des HLA-A*0201-IMP-Komplexes hergestellt werden. Mit deren Hilfe sollten die relevanten Positionen für die Bindung der zu testenden Serumantikörper auf dem pMHC-Komplex charakterisiert werden. Bei der Auswahl der Aminosäurereste der HLA-A*0201-Schwerkette ist entscheidend, dass durch die Mutation die Peptidbindung nicht beeinflusst wird. Aus vorangehenden Arbeiten mit dem TCR und MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern war bekannt, welche Stellen geeignet und sinnvoll sind. Die Aminosäuren dieser Positionen wurden meist durch Alanin ersetzt, vorbestehendes Alanin wurde zu Glycin mutiert. Folgende Mutationen wurden in den Komplex eingebracht:

Tabelle 3: Eingebrachte Mutationen

α 1-Helix	α 2-Helix
Glu55Ala	Trp107Ala
Glu58Ala	Ala150Gly
Asp61Ala	Gln155Ala
Arg65Ala	Ala158Gly
Lys66Ala	Thr163Ala
Gln72Ala	Glu166Ala
Val76Ala	Trp167Ala
	Arg169Ala
	Arg170Ala
	Glu173Ala
	Trp174Ala

E. coli des Stammes BL21-DE3 wurden hierzu mit einem Plasmid codierend für die schwere Kette der mutierten Variante oder des Wildtyps sowie einem Plasmid codierend für eine Biotin-Ligase cotransformiert. In einige Bakterien wurde ein Plasmid mit der genetischen Information für das β 2-Mikroglobulin eingebracht, um ebenfalls die leichte Kette herzustellen zu können. Die in-vivo-biotinylierten α -Ketten bzw. das β 2-Mikroglobulin wurden folglich in inclusion bodies der Bakterienzelle angereichert und konnten mittels Ultraschall herausgelöst werden.

1.1 Kontrolle In-vivo-Biotinylierung mittels Gel Shift Assay

Die In-vivo-Biotinylierung war notwendig, um später im ELISA durch Bindung an Streptavidin eine gleichartige räumliche Ausrichtung aller gefalteten pMHC-Komplexe zu erreichen.

In Bakterien wurde die genetische Information durch ein eine Biotin-Ligase codierendes Plasmid eingebracht und dem Medium zu einem definierten Zeitpunkt Biotin hinzugefügt. Dadurch kam es an der Biotin-Akzeptor-Domäne, welche an die schwere Kette gekoppelt war, zu einer enzymatischen In-vivo-Biotinylierung. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten mindestens 85% der Proteine mit Biotin versehen werden, was im Gel Shift Assay abgeschätzt und kontrolliert werden konnte:

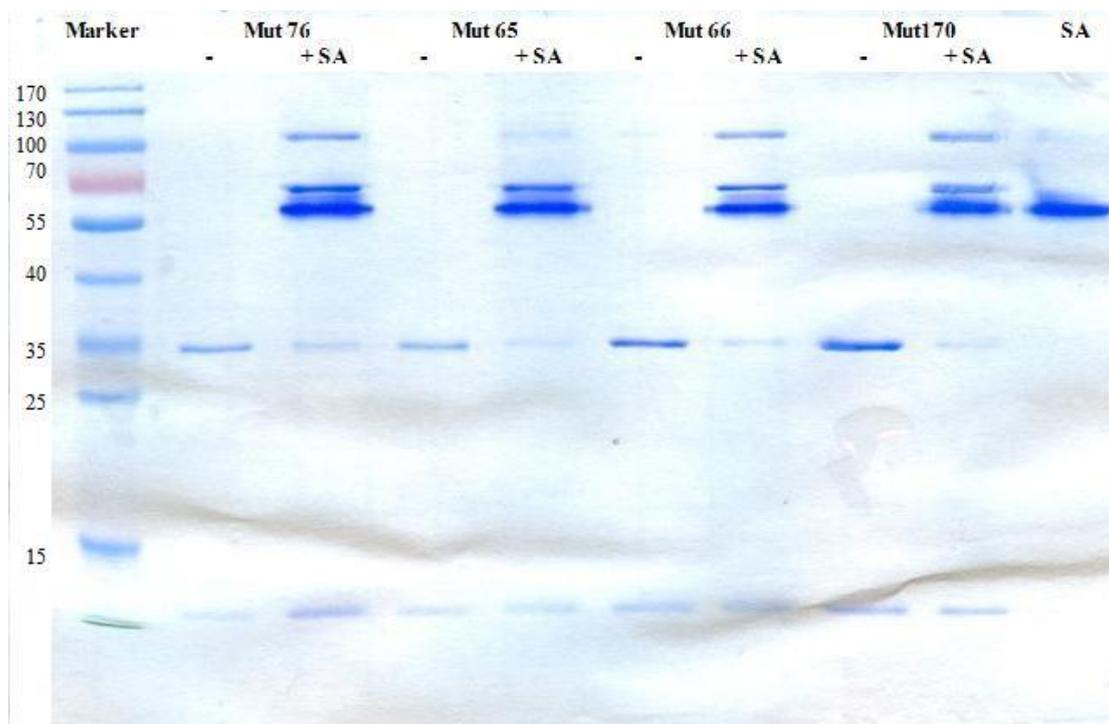


Abb. 6: Gel Shift Assay + SA: Die schweren Ketten mit den Mutationen 76, 65, 66 und 170 wurden jeweils in reiner Form und nach Inkubation mit Streptavidin aufgetragen. Zur Kontrolle wurde auch eine Probe nur mit Streptavidin aufgetragen. Der Shift von 36 kDa zu 100 kDa ist gut zu erkennen.

Exemplarisch sind in Abbildung 6 vier mutierte schwere Ketten dargestellt, die mit einem Überschuss an Streptavidin für 20 Minuten inkubiert und auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt wurden. Verglichen wurde jeweils mit einer Bande, die nur die α -Kette enthielt. Die biotinylierte schwere Kette konnte an das Streptavidin binden und erhöhte dadurch signifikant ihr Molekulargewicht von ca. 36 kDa auf ca. 100 kDa.

Eine schwache Bande mit freier schwerer Kette blieb auch in der Probe mit Streptavidin immer zurück. Durch Vergleich der Intensitäten dieser Bande mit der Kontrollbande der reinen schweren Kette konnte eine effiziente Biotinylierung abgeschätzt werden.

1.2 Faltung und Reinigung

Es schlossen sich die Faltung und Konzentration der HLA-A*0201-IMP-Komplexe an, was 5 Tage in Anspruch nahm. Zur Reinigung der erhaltenen Komplexe wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Die konzentrierten Komplexe wurden über eine Gelfiltrationssäule geleitet. Es konnten mehrere Fraktionen gesammelt und dabei drei Aktivitätspeaks aufgezeichnet werden, was in Abbildung 7A dargestellt ist. Die drei zur Zeit der Aktivitätspeaks gesammelten Fraktionen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 7B und 7C), um den Inhalt der Probe näher zu qualifizieren. Die erste Fraktion entsprach Verunreinigungen, wie z.B. überschüssigem Biotin oder Aggregaten der schweren Kette. Die Zweite ließ eine Bande bei ca. 36 kDa, was dem Molekulargewicht der schweren Kette entsprach und eine Bande bei ca. 11 kDa erkennen, welche als leichte Kette zu identifizieren war. β 2-Mikroglobulin und α -Kette konnten unter nicht-reduzierenden Bedingungen als zwei Banden sichtbar werden, da zwischen diesen keine kovalente Bindung besteht. Somit enthielt die Fraktion 2 die gereinigten pMHC-Komplexe. In der dritten Fraktion wurde das überschüssige freie β 2-Mikroglobulin gesammelt.

Die Konzentration der Probe mit dem gereinigten Komplex wurde anschließend im Photometer durch eine Extinktionsmessung bestimmt.

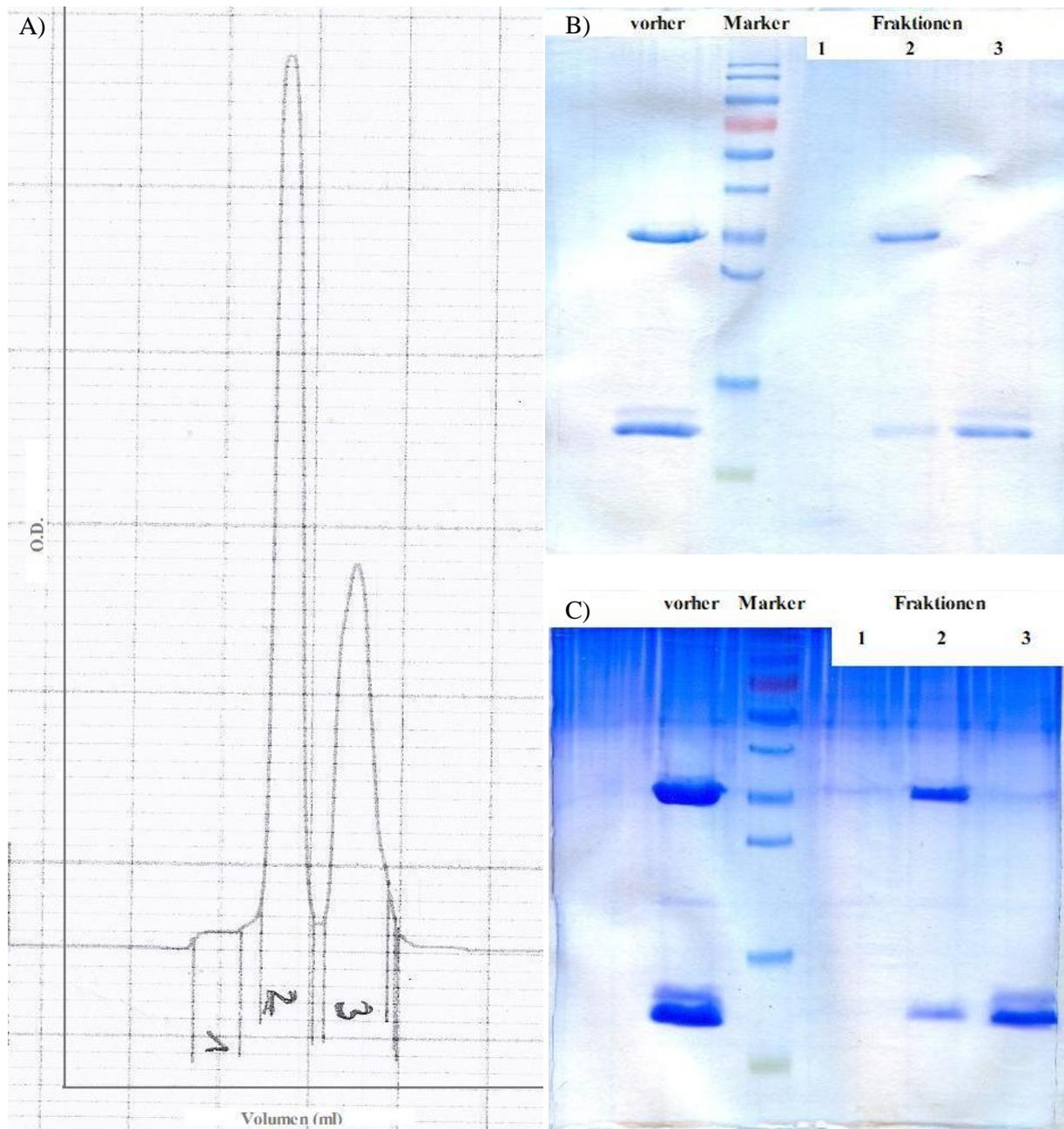


Abb. 7: Reinigung der p-MHC-Komplexe; A) Drei Aktivitätspeaks in der Gelfiltrationschromatographie; B) Mut 155 und C) Mut 158 im SDS-Gel exemplarisch für alle mutierten Varianten des HLA-A*0201-IMP-Komplexes; erste Spalte: Komplex vor der Reinigung, zweite Spalte: Größenmarker, Fraktion 1: Verschmutzung, Fraktion 2: gereinigter Komplex; Fraktion 3: überschüssiges β 2-Mikroglobulin

1.3 Kontrolle der richtigen Faltung

Da für diese Arbeit die Faltung und Stabilität der Komplexe eine große Rolle spielte, wurden sie mittels fünf verschiedenen Antikörpern im ELISA kontrolliert. Aufgrund der Tatsache, dass einige mutierte Varianten des Komplexes erst später als Erweiterung der Arbeit hinzukamen, wurden nicht alle Mutationen mit allen Antikörpern untersucht. Jedoch wurde auf jeder ELISA-Platte immer der

monoklonale Antikörper Tü 155 als Positivkontrolle mitgeführt. Dieser ist spezifisch gegen MHC-Klasse I Moleküle und bindet nur peptidbeladene Komplexe und stellt den Konformations-sensitivsten Antikörper dar (Hutter et al., 1996). Er wurde aus diesem Grund als informativste Kontrolle angesehen und bei jedem Komplex acht Mal getestet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 8 dargestellt. Bei jedem Komplex konnte eine Reaktion mit Tü 155, die mindestens so stark bzw. stärker als bei dem unmutierten Wildtyp Komplex war, nachgewiesen werden. Daraus konnte, aufgrund der Peptid-abhängigen Reaktion des Antikörpers, auf eine Beladung mit einem IMP-Peptid und auf eine korrekte Konformation aller Komplexe geschlossen werden.

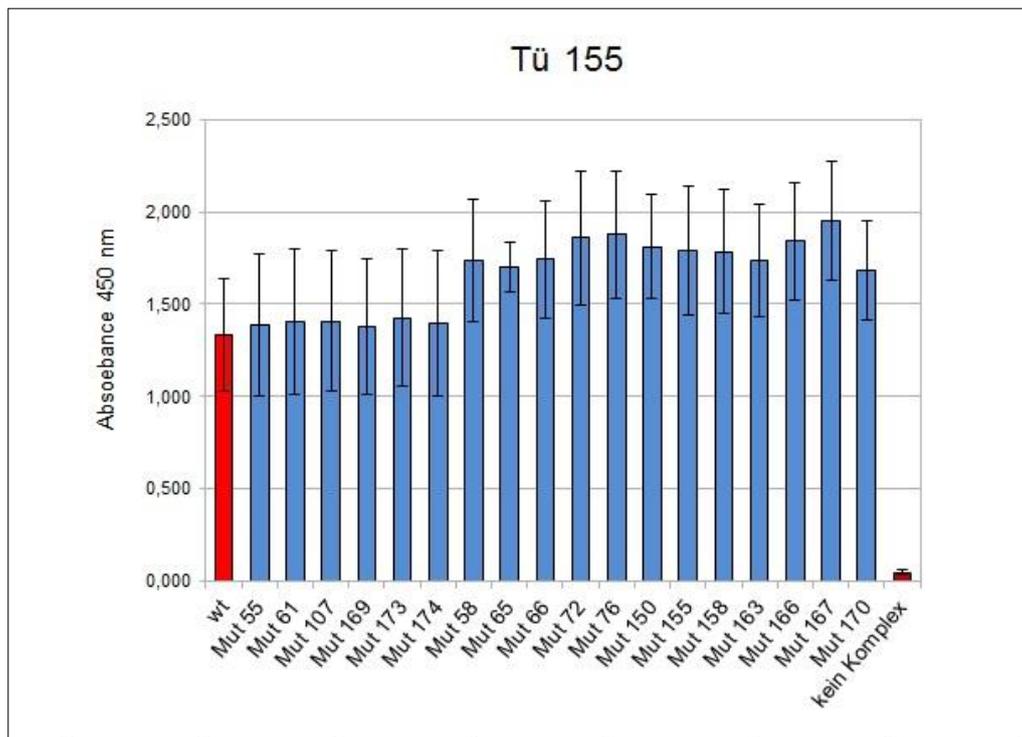


Abb. 8: Kontrolle mit Tü 155; Mittelwerte und Standardabweichung aus acht verschiedenen Testungen, Vergleich Wildtyp (wt, hellrot) mit den mutierten Varianten (blau) und einer Leerkontrolle (kein Komplex, dunkelrot)

Zur weiteren Kontrolle der richtigen Ausrichtung und Faltung der Komplexe im ELISA wurden einige Komplexe zusätzlich mit den monoklonalen Maus-Antikörpern w6/32, BB7.2 und HB28 und einem Kaninchen-Antikörper gegen β 2-Mikroglobulin (MG) getestet (Abbildung 9). Aus der Reaktion mit w6/32 lässt sich schließen, dass es sich bei den Komplexen um richtig konfigurierte HLA-Moleküle der Klasse I handelt. BB7.2 definiert diese als HLA-A*02-Komplexe. HB28 und MG erkennen die leichte Kette und lassen so auf ein überall vorhandenes β 2-Mikroglobulin schließen. Das hohe Signal bei Mut 65 war wahrscheinlich durch die größere Stabilität des Komplexes zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung bedingt, da dieser erst frisch gefaltet und gereinigt war.

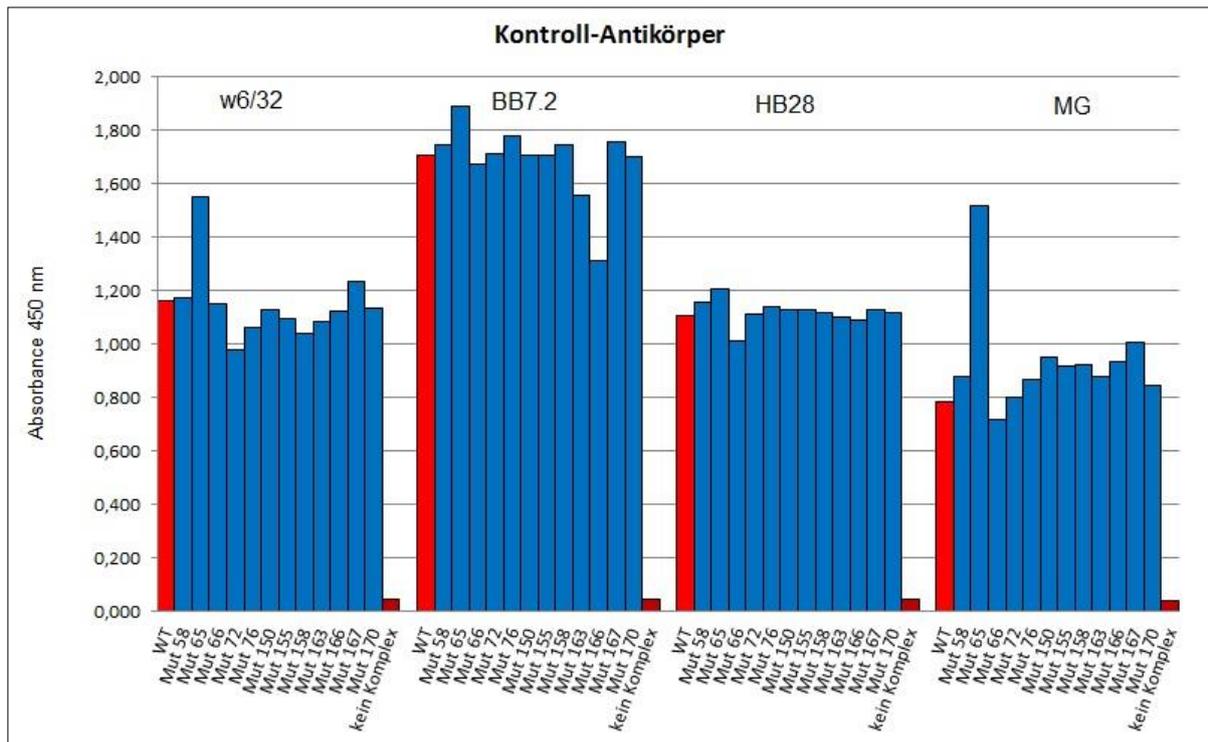


Abb. 9: Kontrolle mit w6/32, BB7.2, HB28 und MG; Die spezifisch auf Epitope im HLA reagierenden monoklonalen Antikörper lassen auf eine korrekte Herstellung der Komplexe schließen; Vergleich Wildtyp (WT, hellrot) mit den mutierten Varianten (blau) und einer Leerkontrolle (kein Komplex, dunkelrot)

Die richtige Konformation der hergestellten pMHC-Komplexe war somit sichergestellt, und sie konnten nun zur Erstellung des Bindungsmodus der zu testenden Serumantikörper verwendet werden.

2 Serumcharakterisierung

In dieser Arbeit wurden insgesamt acht verschiedene humane Seren verwendet.

Diese wurden bei einem Screening freiwilliger Spender identifiziert. Man hatte damals mehrere Seren auf IMP₅₈₋₆₆ oder CMV/HLA-A*0201-Komplex-spezifische Antikörper untersucht. Mittels einem im Methodenteil beschriebenen Verfahren, dem UV-mediated ligand exchange, konnte die Spezifität der gefundenen IgG-Antikörper näher bestimmt werden. Die Seren wurden auf 166 verschiedene Peptide im HLA-A*0201-Komplex getestet und es zeigten sich zwei verschiedene Arten der Bindung der Serumantikörper. Es konnten Immunglobuline identifiziert werden, die ausschließlich das IMP₅₈₋₆₆-Peptid erkennen, jedoch keines der Kontrollpeptide. Hierbei handelt es sich um die Seren WK, HS26045, K321 und V19.0. Zum anderen existieren Antikörper im Serum S22, 201M, B175 und F105, welche eine sehr distinkte Kreuzreaktivität aufweisen. Diese reagieren nicht nur gegen IMP sondern auch gegen andere Peptide im HLA-A*0201-Komplex, wenn diese als n-terminale Aminosäure ein Glycin besitzen, genau wie IMP.

Exemplarisch für alle nicht kreuzreaktiven Seren, ist das Ergebnis des ELISA nach UV-mediated ligand exchange des Serum V19.0 in Abbildung 10 dargestellt. Man konnte hier nur die Reaktion auf den IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex, der als Positivkontrolle diente, als eindeutige Bindung werten. Gegen die anderen Peptide war keine signifikante Reaktion zu erkennen. Als positive Reaktion wurde eine solche gewertet, deren OD über dem des Dreifachen der Negativkontrolle lag. Das Peptid 63 wurde in der Testung ausgelassen, da es IMP entspricht.

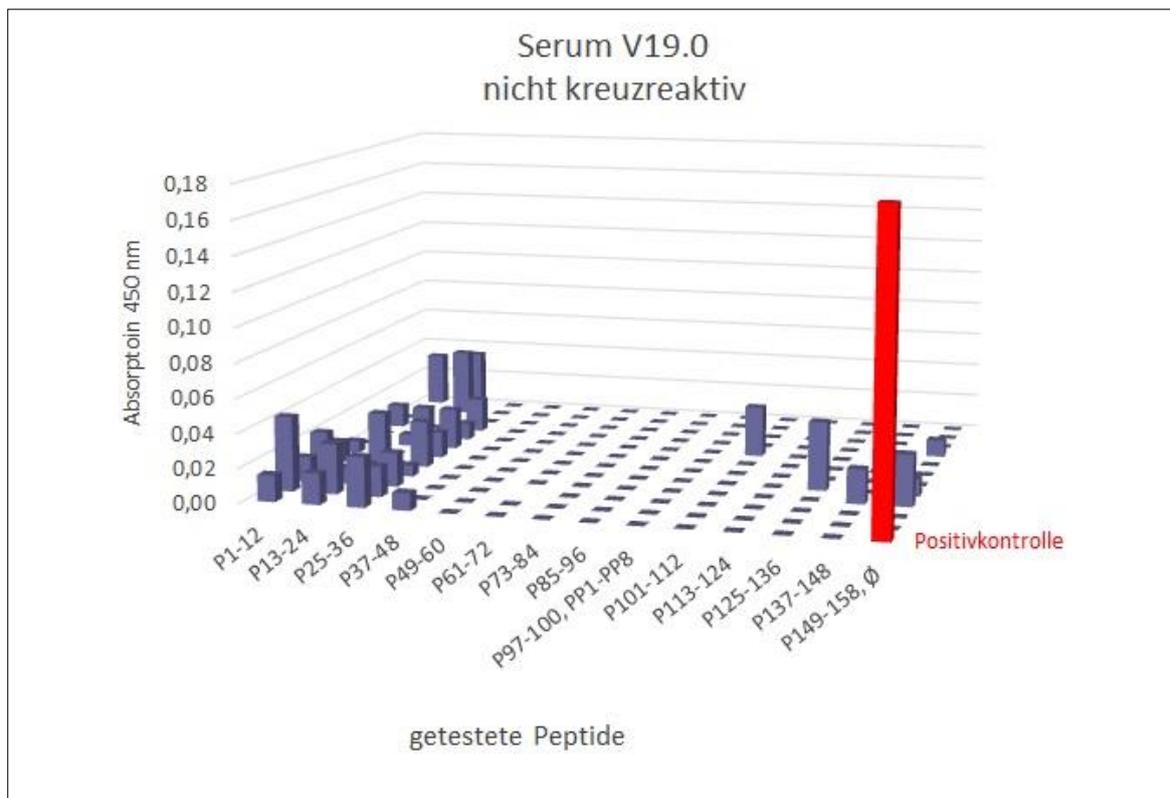


Abb. 10: Bindungsverhalten des Serum V19.0 als Beispiel für alle nicht kreuzreaktiven Seren; 1:100-Verdünnung des Serums, Reaktion auf mittels UV-medaited ligand exchange hergestellte pMHC-Komplexe, nur die Positivkontrolle (IMP) wurde als eindeutiges Signal gewertet, auf andere Peptide ist keine reproduzierbare Reaktion zu erkennen. Peptid 63 wurde ausgelassen, da es IMP entspricht.

Als Beispiel für das Bindungsverhalten der distinkt kreuzreaktiven Serumantikörper dient die Abbildung 11. Das Serum S22 zeigt hier eine Reaktion gegen die Positivkontrolle (IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex) als auch gegen die Peptide P5, 38, 29, 66, 96, 63, 90, 41, 114 und 136, deren Aminosäuresequenz in Abbildung 12 dargestellt ist. Jedes dieser Peptide beginnt an der n-terminalen Stelle mit einem Glycin, was eine Gemeinsamkeit mit dem IMP₅₈₋₆₆-Peptid darstellt. Gegen Peptide im HLA-A*0201-Komplex mit einer anderen n-terminalen Aminosäure konnten keine Bindungen nachgewiesen werden, weshalb von einer distinkten Kreuzreaktivität dieser Seren auszugehen ist.

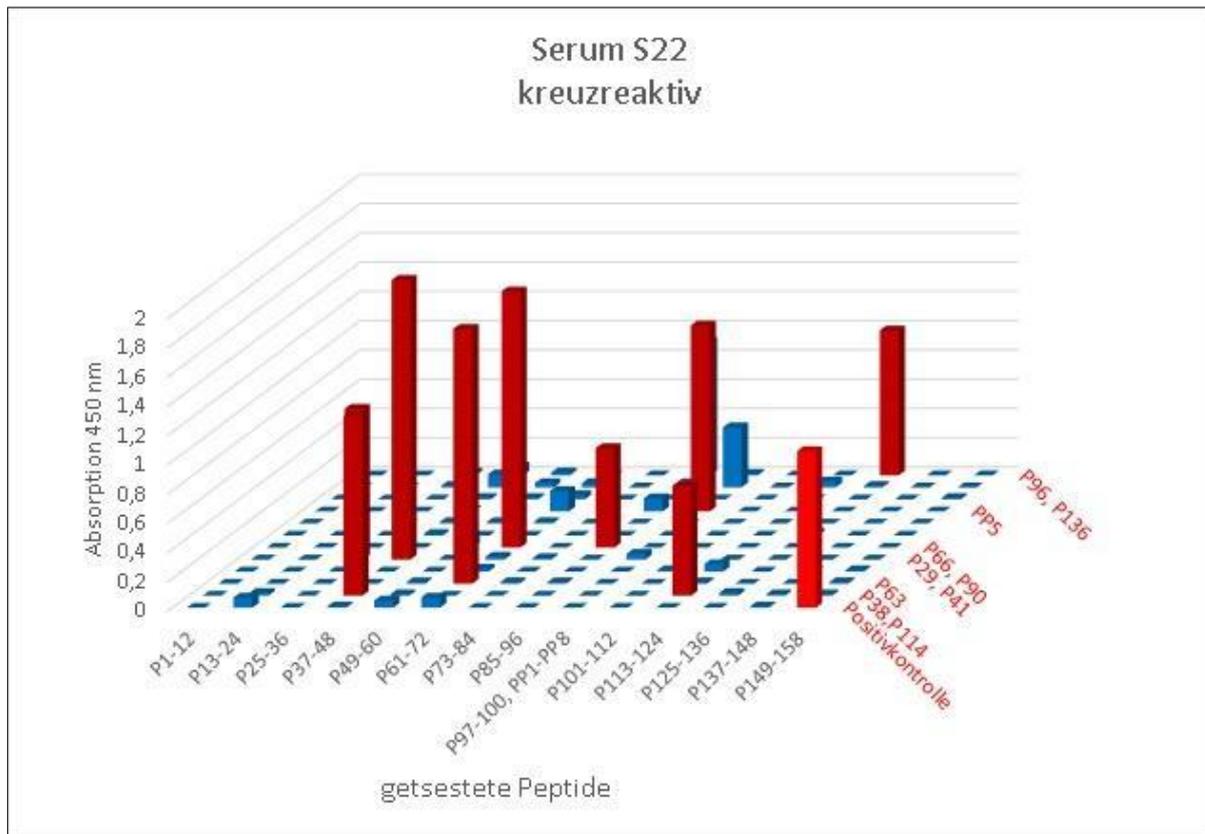


Abb. 11: Bindungsverhalten des Serum S22 als Beispiel für alle kreuzreaktiven Seren; die Positivkontrolle (IMP) wurde als eindeutiges Signal gewertet, auf die Peptide P5, 38, 29, 66, 96, 63, 90, 41, 114 und 136 ist ebenfalls eine reproduzierbare Reaktion zu erkennen.

Peptid:	Sequenz:
P5	GLCTLVAML
38	GLAAPRLSTL
29	GLGGYMLGSV
66	GLNEEIARV
96	GLVPFLVSV
63	GILGFVFTL
90	GLQPEQQLQL
41	GLMKYIGEV
114	GLLVGVALI
136	GAFEHLPSL

Abb. 12: Aminosäuresequenzen; Gemeinsam mit dem IMP₅₈₋₆₆ ist allen Peptiden die Aminosäure Glycin an der n-terminalen Position

Das Serum V19.0 reagiert zudem sehr schwach, weshalb die Werte ca. um das Zehnfache niedriger sind als bei Serum S22, welches dem mit dem höchsten Antikörper-Titer entspricht.

Zur weiteren Bestätigung dieses Bindungsverhalten wurde jedes Serum nochmals auf die so identifizierten pMHC-Komplexe getestet. Die Kreuzreaktivität der Seren S22, 201M, B175 und F105 und die spezifische Reaktivität auf den IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex der Seren WK, HS26045, K321 und V19.0 konnten reproduziert werden und sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt.

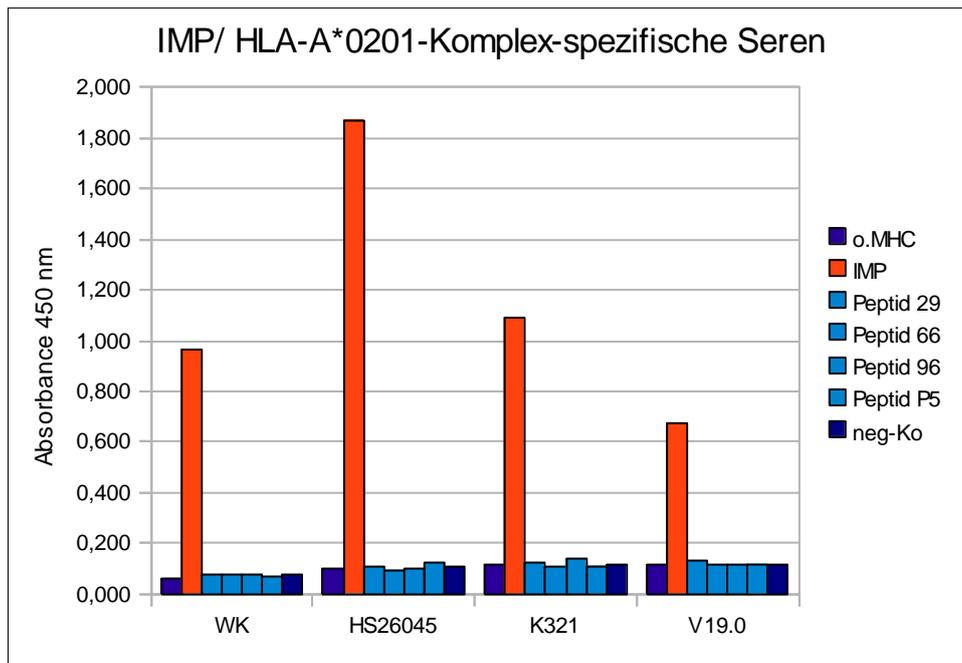


Abb. 13: Kontrolle Bindungsverhalten der $IMP_{58-66}/HLA-A^*0201$ -Komplex-spezifischen Antikörper; keine Reaktion mit anderen pMHC-Komplexen, Bindung nur bei IMP

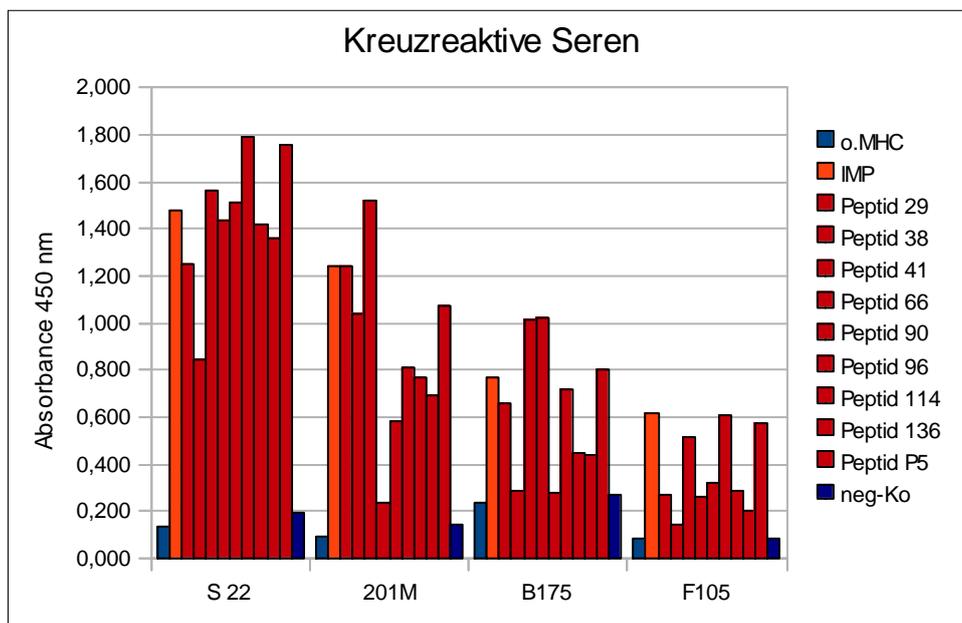


Abb. 14: Kontrolle Bindungsverhalten der kreuzreaktiven Antikörper; alle Seren zeigen eine ähnliche Kreuzreaktivität mit den identifizierten Peptiden

Die so gründlich charakterisierten Seren wurden nun weiter untersucht, um den genauen Bindungsmodus auf dem $IMP_{58-66}/HLA-A^*0201$ -Komplex herauszufinden und Unterschiede zwischen den kreuzreaktiven und spezifischen Seren auszuarbeiten.

3 Bindungsmodus der Serumantikörper

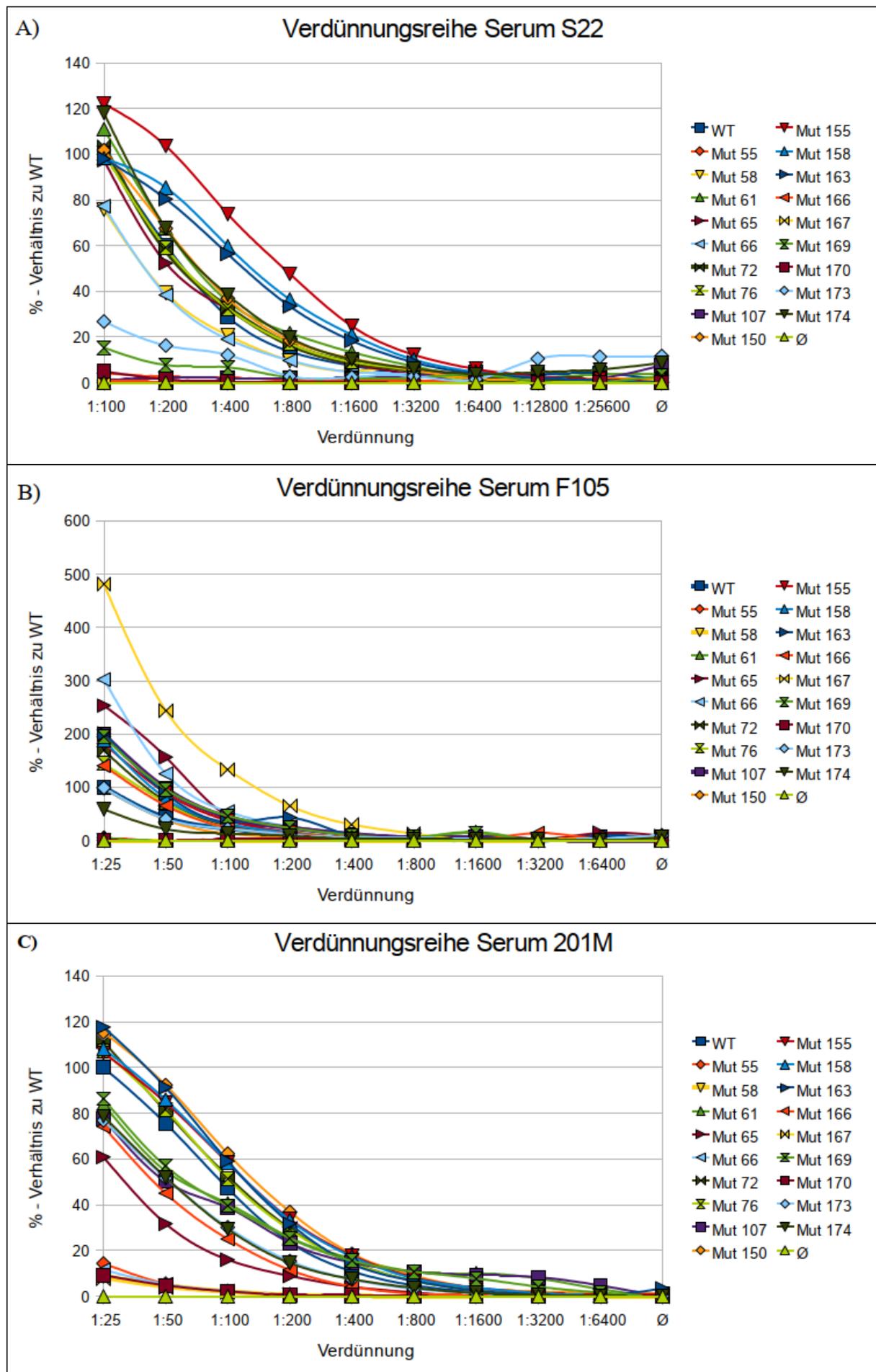
Die hergestellten mutagenisierten Varianten des IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplexes konnten jetzt als rekombinantes, in vitro gefaltetes Antigen im ELISA eingesetzt werden. Auf diese Art und Weise war es möglich die Interaktion mit den Serumantikörpern systematisch zu untersuchen.

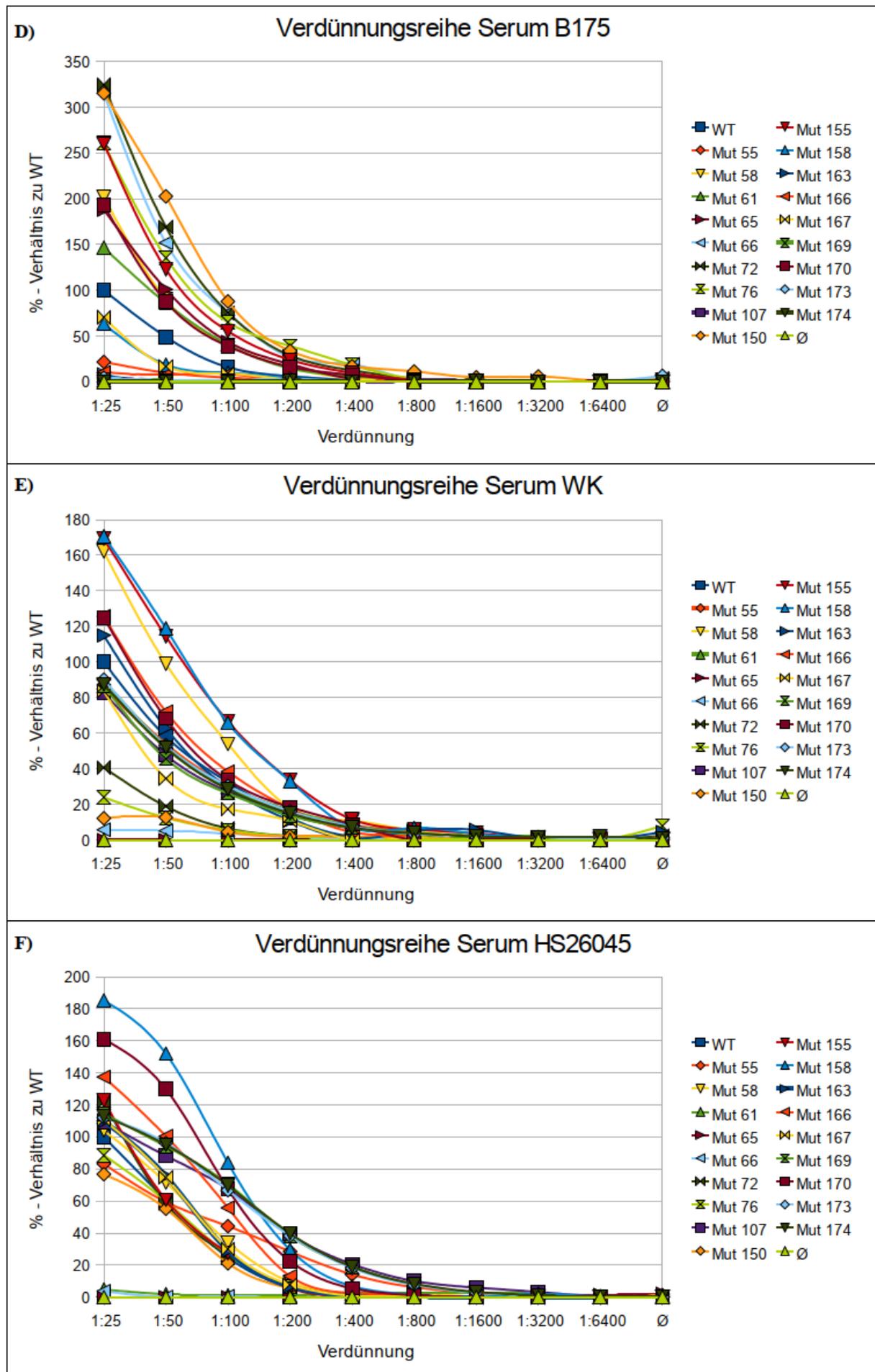
Für alle Seren wurde auf jedem mutierten Komplex eine Titrationskurve angefertigt, um die Bindungsstärke im Vergleich zum Wildtyp abschätzen zu können. Der Kurvenverlauf gab zusätzliche Informationen über die Affinität der Bindung.

Es wurden Verdünnungsstufen von 1:25 bis 1:6400 angefertigt und jeweils auf 5 µg/ml pMHC-Komplex gegeben. Bei Serum S22 wurde mit einer 1:100 Verdünnung begonnen, da es den höchsten Titer aller Seren aufwies und diese so untereinander besser zu vergleichen waren. Zur Kontrolle wurde auf jeder ELISA-Platte eine Reihe mit dem monoklonalen Antikörper Tü 155 mitgeführt, durch dessen Reaktion eine korrekte Faltung und Peptidbeladung gesichert werden konnte.

Die Kurvenverläufe sind zuerst für die distinkt kreuzreaktiven Seren in Abbildung 15 A-D und dann für die IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifischen Seren in Abbildung 15 E-H dargestellt. Alle Zahlenwerte wurden in Prozent im Verhältnis zur Reaktion auf dem Wildtyp Komplex (WT) angegeben, wobei immer der Wert der niedrigsten Verdünnungsstufe als 100% angesehen wurde. Zusätzlich wurde der Hintergrund abgezogen, welcher als Signal des Serums mit Sekundärantikörpern in einem Well ohne pMHC-Komplex definiert war. Alle Werte wurden zudem so angeglichen, dass die Signale des Tü 155 auf den mutagenisierten Varianten, dem Wert des Tü 155 bei Reaktion mit dem Wildtyp Komplex entsprachen.

Festgelegt wurde, dass ein Signalverlust bis auf < 25% (im Verhältnis zum Wildtyp) mit einem Bindungsverlust der Serumantikörper gleichgesetzt werden konnte und somit diese Mutation für die Bindung entscheidend ist und damit einen „hot spot“ darstellt. Durch einen Signalverlust auf < 75% aber >25%, konnte nachgewiesen werden, dass diese Mutation einen negativen Effekt auf die Bindung der Antikörper besitzt, jedoch keinen kompletten Bindungsverlust zur Folge hat. Mehrmals gab es den Fall, dass das Signal auf den mutierten Komplexen im Verhältnis zum Wildtyp stärker wurde (> 200%), was später in der Diskussion wieder aufgegriffen werden soll. Durch diese Definitionen konnten die „footprints“ der Serumantikörper auf dem IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex erstellt werden.





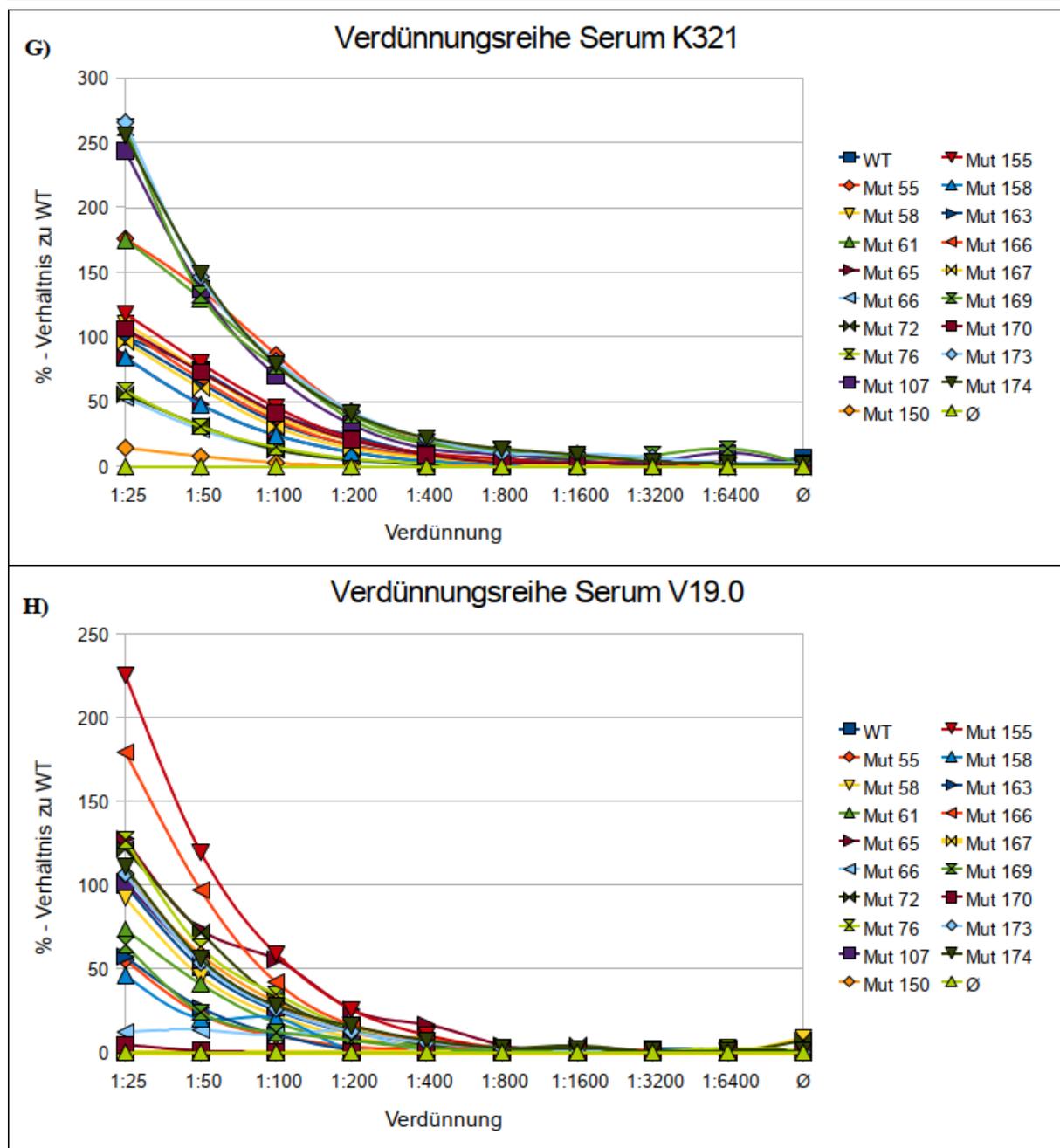


Abb. 15: Titrationskurven der Seren auf den verschieden mutierten $IMP_{58-66}/HLA-A^*0201$ -Komplexen; Verdünnungsstufen der Seren auf 5 $\mu\text{g/ml}$ pMHC-Komplex; A) Serum S22; B) Serum F105; C) Serum 201M; D) Serum B175; E) Serum WK; F) Serum HS26045; G) Serum K321; H) Serum V19.

Als „hot spots“ in der Bindung der Antikörper des Serums S22 ließen sich die Positionen 55, 107, 166, 167, 169 und 170 definieren. Einen weiteren Effekt auf die Bindungsfähigkeit war an Position 173 zu erkennen.

Die Serumantikörper F105 zeigten Bindungsverluste bei Mutationen der Positionen 55, 58, 61 und 170. Die Mutation 174 hatte einen Signalverlust auf 59% zur Folge.

Wichtige Positionen in der Bindung des Serums 201M waren 55, 58, 66, 167 und 170. Ein Signalverlust konnte ebenfalls durch die Mutation der Stellen 65 und 166 erreicht werden.

Das Bindungsverhalten der Antikörper des Serums B175 ließ die Positionen 55, 107, 163, 166, 169, 173 und 174 als „hot spots“ erkennen. Auch die Mutationen an Stelle 158 und 167 zeigten Effekte auf die Bindungsstärke.

Gemeinsam war allen kreuzreaktiven Seren der starke Effekt auf die Bindung an Position 55. Die Mutation Glu55Ala hatte bei allen einen völligen Bindungsverlust zur Folge. Bei drei von vier Seren spielte die Position 170 eine wichtige Rolle für die Bindung. Durch Mutation 166 und 167 verloren zwei Seren ihre Bindungsfähigkeit und ein Serum wurde darin eingeschränkt. Insgesamt liegen diese „hot spots“ eher seitlich am IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex und im Bereich des n-terminalen Endes des IMP-Peptides, womit sich ihre Kreuzreaktivität in diesem Bereich erklären ließe. Die Peptidbindungstasche wird durch den Antikörper nicht überspannt, sondern der Komplex wird von der Seite angegangen.

Die IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifischen Seren ließen jedoch einen anderen Bindungsmodus erkennen.

Das Serum WK zeigte einen Bindungsverlust bei den Mutationen an den Positionen 65, 66, 76 und 150. Eingeschränkte Bindungsfähigkeit bestand noch nach Mutation an der Position 72.

Bei dem Serum HS26045 konnten die Positionen 61, 65 und 66 als wichtigste Kontaktstellen identifiziert werden.

Die Antikörper des Serums K321 verloren ihre Bindungsfähigkeit bei Mutation an der Position 150, einen weiteren Effekt hatten die Mutationen 66, 72 und 76.

„Hot spots“ der Bindung des Serum V19.0 waren an der Stelle 66, 167 und 170 im Komplex. Eine eingeschränkte Bindungsfähigkeit brachten die Mutationen 58, 158, 163 und 169 mit sich.

Für die spezifisch reagierenden Seren war insgesamt die Position 66 die wichtigste Bindungsstelle. Durch deren Mutation verloren drei von vier Seren ihre Bindungsfähigkeit, eines wurde darin eingeschränkt. Die Positionen 65 und 150 konnten für zwei Seren als „hot spot“ definiert werden.

Diese Bindungsstellen liegen auf der α 1- und α 2-Helix in räumlicher Nähe zum zentralen Bereich des IMP₅₈₋₆₆ Peptides und übergreifen die Peptidbindungstasche. Zudem ist bekannt, dass sich die für den TCR relevanten Kontaktpunkte auch im Bereich der Positionen 65 und 66 befinden (Baker et al., 2001 und 2002), was auf ein ähnliches Bindungsmuster schließen lässt. Dies stützt die Theorie, dass diese Serumantikörper in Analogie zum TCR spezifisch Peptide im HLA-A*0201-Kontext erkennen können.

Die Signalstärken auf den mutierten Komplexen im Verhältnis zum Wildtyp sind in den Abbildungen 16 und 17 zusammengefasst.

	S22	F105	201M	B175
wt	100%	100%	100%	100%
Mut 55	4%	6%	14%	22%
Mut 58	76%	1%	9%	202%
Mut 61	111%	5%	84%	147%
Mut 65	97%	253%	61%	188%
Mut 66	77%	302%	12%	315%
Mut 72	103%	169%	111%	325%
Mut 76	100%	144%	107%	261%
Mut 107	1%	199%	78%	4%
Mut 150	102%	98%	115%	315%
Mut 155	122%	182%	106%	260%
Mut 158	98%	188%	108%	63%
Mut 163	98%	201%	118%	7%
Mut 166	1%	141%	74%	10%
Mut 167	0%	481%	8%	70%
Mut 169	15%	194%	86%	3%
Mut 170	5%	1%	9%	193%
Mut 173	27%	99%	77%	4%
Mut 174	118%	59%	79%	0%

Abb. 16: Bindungsverhalten kreuzreaktive Seren in Prozent zum Wildtyp; rot: Bindung < 25%, gelb: Bindung 25% - 75%, türkis: Bindung > 200%

	WK	HS26045	K321	V19.0
wt	100%	100%	100%	100%
Mut 55	87%	83%	176%	55%
Mut 58	162%	104%	111%	92%
Mut 61	89%	5%	175%	73%
Mut 65	0%	0%	84%	128%
Mut 66	6%	4%	53%	12%
Mut 72	41%	122%	56%	121%
Mut 76	24%	89%	58%	127%
Mut 107	83%	110%	244%	106%
Mut 150	12%	77%	14%	102%
Mut 155	169%	123%	118%	225%
Mut 158	171%	185%	84%	46%
Mut 163	115%	110%	99%	57%
Mut 166	126%	138%	106%	179%
Mut 167	84%	111%	96%	0%
Mut 169	87%	115%	262%	64%
Mut 170	125%	161%	106%	5%
Mut 173	90%	112%	266%	107%
Mut 174	87%	113%	255%	111%

Abb. 17: Bindungsverhalten IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifische Seren in Prozent zum Wildtyp; rot: Bindung < 25%, gelb: Bindung 25% - 75%, türkis: Bindung > 200%

Aus den so gewonnenen Daten ließen sich nun anschauliche Modelle für den Bindungsmodus auf dem IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex erstellen. Diese sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.

Man erkennt in den Abbildungen die zwei unterschiedlichen Bindungsmodi. Die kreuzreaktiven Seren zeigen eine eindeutige seitliche Bindung am n-terminalen Ende des Peptids. Die spezifischen Serumantikörper binden eher zentral, meist das Peptid überspannend, ähnlich dem Bindungsmodus des T-Zell-Rezeptors.

Für einen besseren Überblick sind in Abbildung 18 noch einmal alle mutierten Stellen in der Tertiärstruktur des Komplexes hervorgehoben.

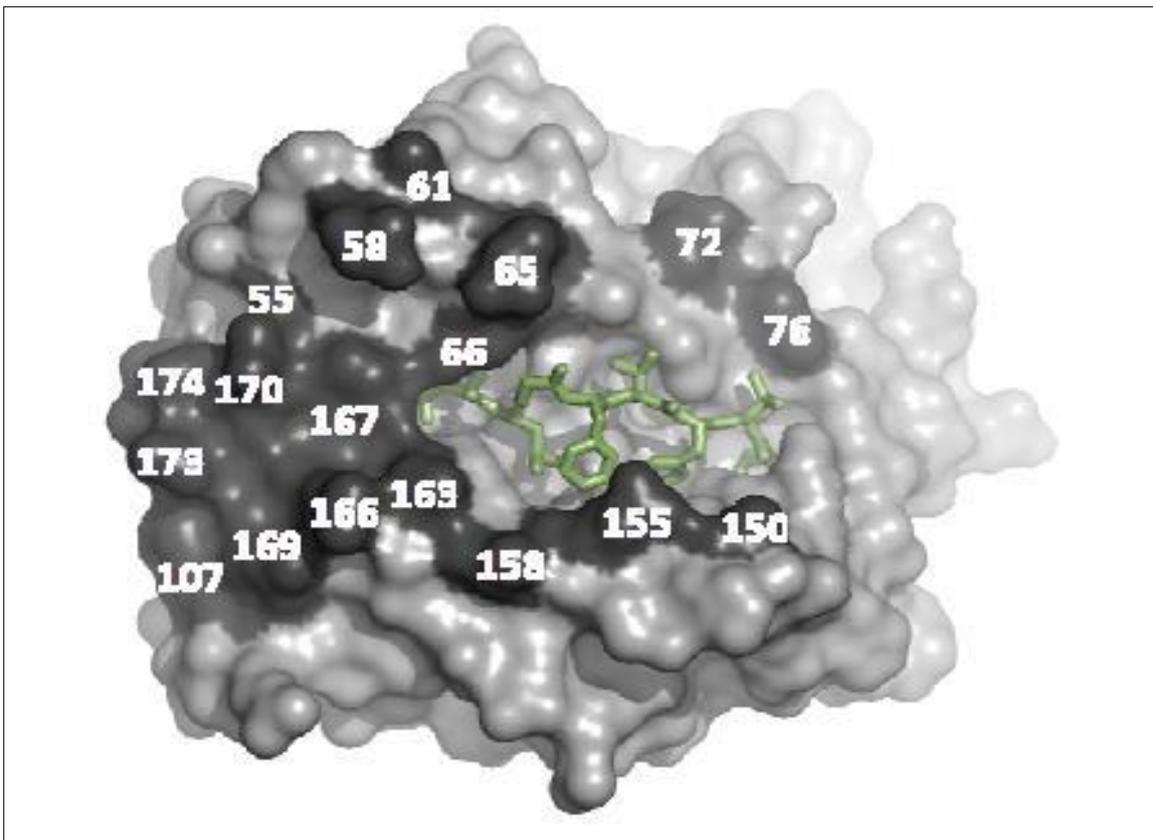


Abb. 18: Räumliche Darstellung der eingebrachten Mutationen im HLA-A*0201-Komplex; Ansicht von „oben“, der dem TCR zugewandten Region. Das IMP Peptid ist grün, die α 1-Helix kommt oberhalb, die α 2-Helix unterhalb zur Darstellung

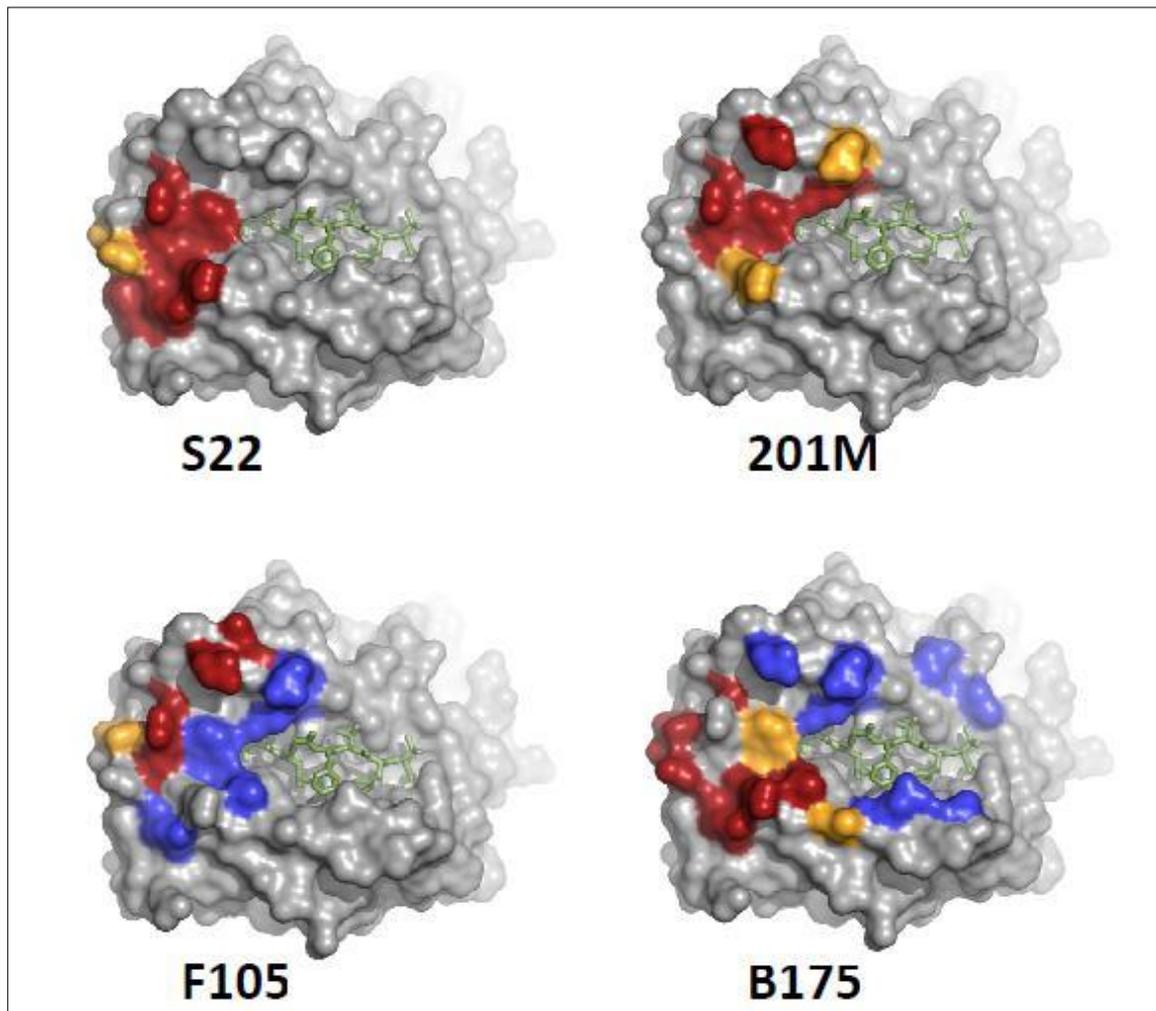


Abb. 19: Model des HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutationen der schweren Kette auf das Bindungsverhalten der kreuzreaktiven Serumantikörper; rot: Bindung < 25%, gelb: Bindung 25-75%, blau: Bindung > 200% im Verhältnis zum Wildtyp

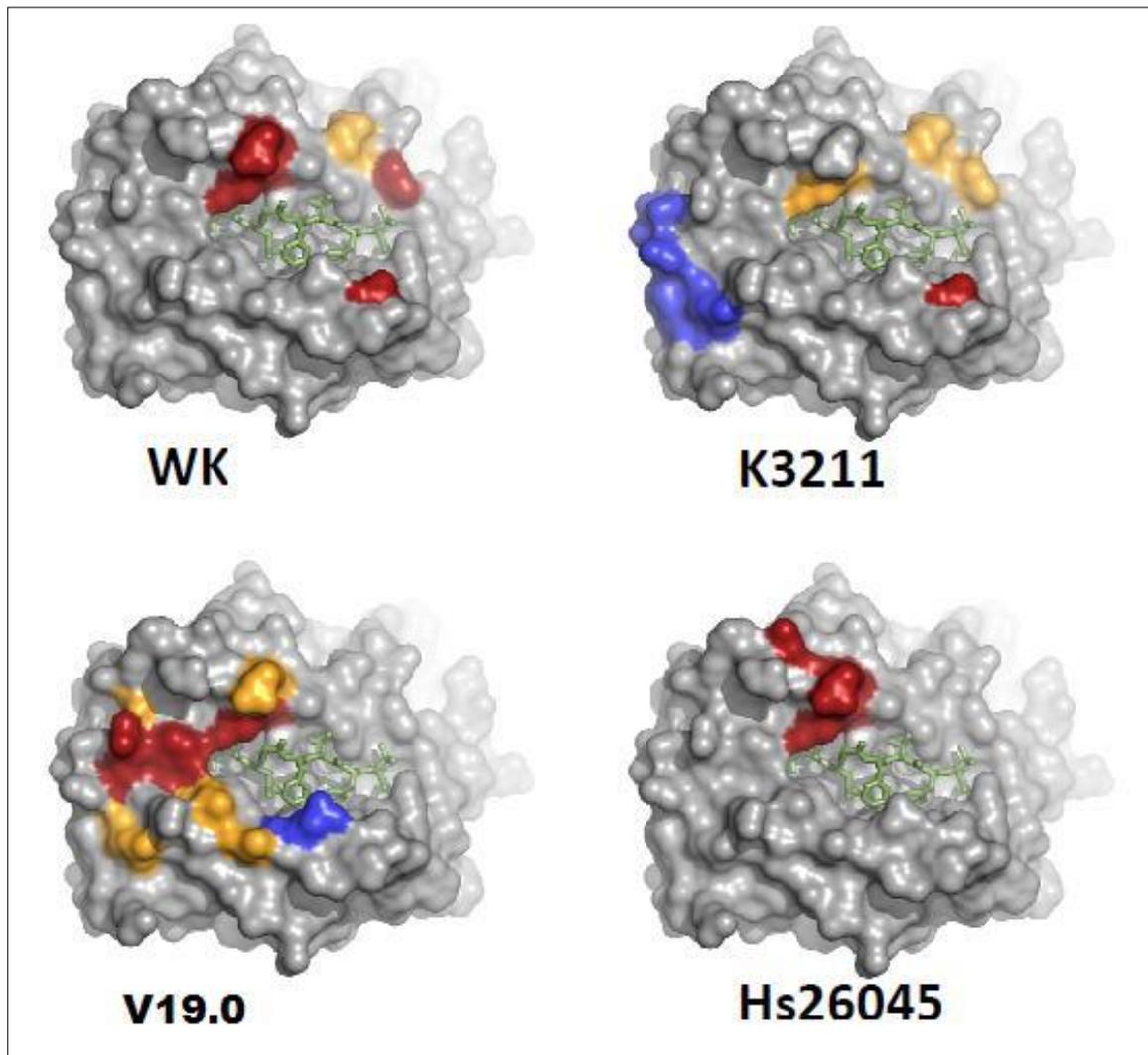


Abb. 20: Model des HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutationen der schweren Kette auf das Bindungsverhalten der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex spezifischen Serumantikörper; rot: Bindung < 25%, gelb: Bindung 25% - 75%, blau: Bindung > 200% im Verhältnis zum Wildtyp

Diskussion

1 Herkunft der verwendeten Seren - Eine neue Kategorie der Antikörper

Der MHC-Komplex der Klasse I, bestehend aus einer schweren α -Kette, dem $\beta 2$ -Mikroglobulin und dem Peptid, stellt das Ziel für $CD8^+$ T-Zellen und deren TCR dar. Dass auch Antikörper gezielt einen pMHC-Komplex erkennen können, war bisher nicht bekannt. Solche alloreaktiven Antikörper, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden vormals nicht in Menschen oder anderen Spezies identifiziert. Sie repräsentieren deshalb eine neue Kategorie von Antikörpern, welche sich klar von Antikörpern gegen das alleinige HLA-Molekül wie sie bei Multipara oder bei der Transplantatabstoßung gefunden werden abgrenzen. (Held et al., 2015)

Der genaue Entstehungsmechanismus dieser Antikörper bleibt weiterhin unklar. Eine Theorie ist, dass es sich hier um einen Prozess während der Schwangerschaft handelt, ähnlich dem der Entstehung einer Rhesusinkompatibilität.

Alle Frauen in deren Seren Antikörper gefunden wurden, zeichneten sich durch mindestens eine vorbestehende Schwangerschaft aus (auch Primipara), was die Hypothese unterstützt, dass diese Antikörper im Verlauf einer Schwangerschaft durch Alloimmunisation entstanden sein könnten. Die Tatsache, dass auch bereits bei Primipara solche Antikörper gefunden werden konnten, weist auf eine hohe Immunogenität des Antigens, also des erkannten pMHC-Komplexes, hin.

Die Produktion dieser IgG-Antikörper in vivo setzt eine Präsentation des Antigens an B-Zellen im Keimzentrum voraus. Denn erst dort findet die somatische Hypermutation und der Antikörper-Klassenwechsel statt (Klein und Dalla-Favera, 2008).

Es muss also angenommen werden, dass im Sinne eines fetomaternalen Mikrochimärismus, die pMHC-Komplexe von allogenetischen APZ im Keimzentrum präsentiert werden.

Nachgewiesenermaßen kann während der Schwangerschaft eine geringe Anzahl an Zellen von der Mutter in das Kind übergehen und umgekehrt und für Jahre dort persistieren (Maloney et al., 1999; Loubière et al., 2006).

Manche dieser Zellen besitzen die Fähigkeit von Stammzellen, sich in alle Zellarten zu differenzieren (Seppanen et al., 2013). Diese Theorie könnte erklären, dass die Antikörper auch in männlichen Individuen gefunden wurden.

Andererseits wurde zusätzlich Nabelschnurblut der Neugeborenen untersucht und die gleichen Antikörper im fetalen Blut gefunden, was die Theorie unterstützt, dass die Antikörper in den Müttern produziert und diaplazentar in die Feten übergehen können (Held et al., 2015).

Serumantikörper gegen pMHC-Komplexe konnten nur in gesunden Individuen gefunden werden, die selbst kein HLA-A*0201 exprimieren. In den Experimenten von Held et al, 2015 wurde die Alloreaktivität dieser Antikörper bewiesen. Die Serumantikörper zeigten keine Bindung an eigenen HLA-Komplexen, welche IMP gebunden hatten, eine bestehende Autoimmunität konnte somit ausgeschlossen werden.

Insgesamt ergaben sich daraus zwei Fragen. Zum einen welche Funktion solche Antikörper in menschlichen Organismus übernehmen könnten und zum anderen wie der Bindungsmodus eines solchen Antikörpers am pMHC-Komplex aussieht.

Den Bindungsmodus am IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex genauer zu untersuchen und dadurch die Spezifität der Antikörper intensiv zu analysieren war Gegenstand dieser Arbeit. Die Bindungsstellen an der α -Kette des MHC-Komplex wurden genau herausgearbeitet und dadurch diese Interaktion gründlich charakterisiert.

2 Methoden

2.1 UV-mediated ligand exchange

(Rodenko et al., 2006)

Um die von freiwilligen Probanden erhaltenen Seren auf das Vorhandensein von pMHC-Komplex spezifischen Antikörper zu screenen, mussten die Seren zu Beginn dieser Arbeit auf vielen verschiedenen pMHC-Komplexen auf ihre Bindungsfähigkeit getestet werden. Dies geschah mit Hilfe des UV-mediated ligand exchange. Die Methode hat gegenüber herkömmlichen Methoden, pMHC-Komplexe herzustellen, den Vorteil, dass damit eine sehr hohe Durchsatzrate diverser pMHC-Komplexe erreichbar ist. Alternative Methoden beruhen auf dem Prinzip, dass die Komplexe mit dem spezifischen Peptid gefaltet werden müssten, dabei ist es kaum möglich hunderte von verschiedenen pMHC-Komplexen herzustellen. Mit der Methode des UV-exchange wird nur ein pMHC-Komplex gefaltet und zwar mit einem UV-sensitiven Peptid, welches durch UV-Licht gespalten und aus der Bindungstasche entfernt werden kann. Die Reaktion findet in einer 96-Well-Platte statt und bietet damit die Möglichkeit 96 verschiedene Komplexe auf einmal herzustellen, indem in jedem Well das UV-sensitive Peptid durch ein beliebiges anderes bindungsfähiges Peptid ersetzt wird.

Diese Methode ist hilfreich für zahlreiche Fragestellungen. Zum einen können damit bindungsfähige Liganden der MHC-Moleküle der Klasse I identifiziert werden. Zum anderen können gezielt hergestellte pMHC-Komplexe genutzt werden T-Zell-Aktivität und - Spezifität zu untersuchen oder wie in dieser Arbeit, bindungsfähige Antikörper mittels ELISA zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Methode ist es

zudem möglich lösliche pMHC-Multimere herzustellen und reaktive T-Zellen zu isolieren, was Grundsteine für T-Zell gesteuerte Immuntherapien legt (Bentzen und Hadrup, 2017).

Mittels UV-mediated ligand exchange konnten die Antikörper der verschiedenen Seren in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die oben beschriebenen spezifischen Antikörper, welche ausschließlich den HLA-A*0201-Komplex erkannten wenn IMP₅₈₋₆₆ gebunden war und die distinkt kreuzreaktiven Antikörper, welche auch andere Peptide, mit Glycin als n-terminale Aminosäure, im Komplex erkennen konnten.

2.2 Herstellen der mutierten Komplexe und Lokalisation der Bindungsstellen

Um die Bindungsstellen der Antikörper an der α -Kette zu lokalisieren wurden Mutationen eingebracht und die Komplexe nun mit der herkömmlichen Methode gefaltet. Dabei handelt es sich um eine etablierte Methode stabile pMHC-Komplexe herzustellen. Es wurde zudem darauf geachtet, dass die eingebrachten Mutationen die Peptidbindung nicht beeinflussen und somit zu einer Konformationsänderung der Komplexe führen. Denn nur MHC-Moleküle, die ein Peptid in ihrer Bindungstasche besitzen, nehmen die richtige Faltung und Konformation ein. (Wang et al., 2002; Rudolph et al. 2006)

Die richtige Faltung und Peptidbeladung der Komplexe wurde im ELISA mittels mehreren Kontrollantikörpern überprüft (Tü 155, w6/32, BB7.2, HB28 und MG). Auch die Biotinylierung wurde zuvor mittels Gel Shift Assay überprüft, um eine korrekte Ausrichtung im ELISA zu gewährleisten. Es konnte so mit großer Sicherheit angenommen, dass die Komplexe ein Peptid in ihrer Bindungstasche besaßen, ein β 2-Mikroglobulin gebunden hatten und die richtige Ausrichtung in der 96-Well-Platte eingenommen hatten.

Die Methoden wurden somit korrekt durchgeführt und die Lokalisation der „hot spots“ der Bindung im ELISA konnte vollzogen werden.

3 Ergebnisse

Es konnten zwei verschiedene Bindungsmodi herausgearbeitet werden.

3.1 Bindungsmodus ähnlich dem des TCR

Baker et al. untersuchten 2001 zuerst den A6 TCR, welcher spezifisch an den HTLV-I Tax₁₁₋₁₉/HLA-A2-Komplex bindet. Durch Strukturanalysen des trimolekularen Komplexes konnten 15 Aminosäuren in der schweren Kette des HLA identifiziert werden, die für die Bindung eine wichtige Bedeutung haben könnten. Um dies näher einzugrenzen wurden an die bekannten Kontaktstellen der α 1- und α 2-Helix

Mutationen eingebracht. Die Interaktion zwischen den mutierten löslichen pMHC-Komplexen und den T-Zell-Rezeptoren wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Zusätzlich konnten Zellen hergestellt werden, die die mutierten Komplexe auf der Oberfläche tragen. Diese wurden dazu verwendet, die T-Zell-Aktivierung mit Hilfe spezieller T-Zell-Assays, wie z.B. Messung der Zelllyse oder der INF- γ - und MIP-1 β -Ausschüttung, zu quantifizieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass nur zwei Mutationen, nämlich R65A und K66A, die Bindung des TCR am Tax/HLA-Komplex stark beeinflussten. Um dies auf alle T-Zell-Rezeptoren verallgemeinern zu können wurde die Versuchsreihe erweitert. Unter anderem wurden der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex und drei weitere pMHC-Komplexe mit dafür spezifischen CTL untersucht und herausgefunden, dass auch die Position 155 einen wichtigen Kontaktpunkt darstellt und das einige TCR spezifisch für den IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex auch nicht von Mutationen an Position 65 und 66 beeinflusst wurden.

Weiterhin testeten Rudolph et al, 2006 24 TCR/pMHC-Komplexe auf ihre wichtigsten Bindungsstellen. Es konnte kein komplett einheitlicher Bindungsmodus festgestellt werden, jedoch ließen sich Kontaktpunkte herausarbeiten, welche öfter an der Interaktion zwischen TCR und MHC beteiligt waren als andere. Es wurden ebenfalls die Aminosäurereste in Position 65 und 155 als häufigste Kontaktpunkte dargestellt.

In meiner Arbeit wurden zwei verschiedene Bindungsmodi der Antikörper aufgezeigt.

Die HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifischen Antikörper zeigten zu den oben aufgeführten Arbeiten einige Parallelen auf. Es wurde auch hier die Position 66 als wichtigste Bindungsstelle herausgearbeitet. Ebenso zeigte sich die Position 65 als relevanter Kontaktpunkt. Lediglich Mutationen an der Position 155 ergaben keinen Bindungsverlust. Die räumlich nicht weit entfernte Position 150 schien noch eine wichtigere Rolle zu spielen.

Der Bindungsmodus der HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifischen Antikörper schien somit dem des TCR sehr ähnlich zu sein.

2009 entwickelten Neumann et al. Fab-Antikörper, die die Reaktion spezifischer T-Zellen am SSX2₁₀₃₋₁₁₁/HLA-A*0201-Komplex blockieren konnten. Dies erfolgte durch eine Verdrängung des TCR durch eine kompetitive Bindung der Fab-Antikörper am pMHC-Komplex. Erneut wurde durch Einbringen von Mutationen in der schweren Kette die wichtigen Bindungsstellen dieser Fab-Antikörper herausgearbeitet, da diese denen des TCR entsprechen mussten. Es ergab sich die Position 66 in der schweren Kette als wichtigster Kontaktpunkt. Zudem konnte durch Mutation an Position 150 eine Abschwächung der Bindung der Fab-Antikörper verzeichnet werden.

Dies deckt sich erneut mit den Ergebnissen meiner Arbeit. Auch hier zeigten sich die Positionen 66 und 150 als wichtige Bindungsstellen der HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifischen Antikörper.

Der TCR, die Fab-Antikörper und die HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifischen Antikörper scheinen somit das gleiche bzw. ein ähnliches Epitop zu erkennen.

Man kann annehmen, dass eine Hemmung der Bindung des TCRs somit ebenso mit den HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplex-spezifischen Antikörpern möglich sein müsste und evtl. nur bedingt durch eine viel niedrigere Konzentration im Serum noch nicht nachweisbar war.

3.2 Neuer Bindungsmodus

MHC der Klasse I binden normalerweise Peptide einer Länge von 8-9 Aminosäureresten. Die nach oben gerichteten Reste stehen der TCR-Interaktion zur Verfügung. Es können auch längere Peptide gebunden werden, die entweder am c-terminalen Ende überhängen oder sich aus der Bindungstasche hervorwölben, wenn sie an beiden Enden fixiert in der Tasche liegen.

In einer Publikation von Yu Chi Liu et al., 2012, wurden Bindungsmodi drei verschiedener TCR an einem MHC-Komplex mit einem „super bulged“ viralen Peptid untersucht. „Super bulged“ bedeutet, dass in der Bindungstasche des MHC ein längeres Peptid als normal gebunden war, welches sich aus der Tasche hervorwölbt und so eine Hürde für die normale TCR-Bindung darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass ein TCR (SB47) einen ganz neuen zuvor noch nicht beschriebenen Bindungsmodus aufwies.

Dieser TCR dockte von der n-terminalen Seite des Peptides an und wies die Positionen 55 und 61 als wichtige „hot spots“ der Bindung auf. Auch Position 170, 166 und 163 waren herausgearbeitete Bindungspunkte.

In einer Arbeit von Kok Fei Chan et al. Im Jahr 2018 wurden zwei weitere TCR auf ihren Bindungsmodus an einem MHC-Komplex mit einem „super bulged“ Peptid (13 Aminosäuren) untersucht. Auch hierbei ergab sich, dass sich der Bindungsmodus in Richtung des n-terminalen Endes des Peptides her verschiebt. Es wurden in dieser Arbeit erneut die Positionen 163 und 166 als wichtige „hot spots“ angesehen. Weiterhin zählte noch die Position 167 als nachgewiesene Bindungsstelle.

Dies deckt sich nun mit dem Bindungsmodus der hier verwendeten distinkt kreuzreaktiven Antikörper. Allen gemeinsam war in meiner Arbeit der Bindungsverlust bei Mutation an Position 55. Auch die Mutation an den Positionen 170, 166 und 167 zeigten nachweislich eine Abschwächung der Bindung in drei von vier Seren. Die Mutation an Position 163 führte bei einem Serum zur Abschwächung der Bindung.

In beiden Arbeiten wurde zusätzlich die Position 62 als wichtiger Bindungspunkt hervorgehoben. Diese wurde in meiner Arbeit jedoch nicht untersucht. Es wurde aber die Abschwächung an den Positionen 55 und 61 (ein Serum) nachgewiesen, was darauf hindeuten könnte, dass auch die benachbarte Position 62 ein „hot spot“ darstellen könnte.

In beiden Publikationen handelte es sich zwar um eine konformationell andere Situation aufgrund der Bindung eines sehr großen Peptides in der Bindungstasche, jedoch zeigt dieser Bindungsmodus eine starke Ähnlichkeit zu dem der kreuzreaktiven Antikörper dieser Arbeit. Spekulativ könnte man den gebundenen TCR an einem pMHC-Komplex mit Peptid normaler Größe sehen wie ein solches „super bulged“ Peptid und könne daraus schlussfolgern, dass der TCR und ein kreuzreaktiver Antikörper nebeneinander am MHC-Peptid-Komplex binden könnten. Dies könnte die Immunreaktion verstärken bzw. abschwächen oder in anderer unbekannter Art und Weise regulieren.

Es stellt sich dann jedoch noch die Frage, warum ein solcher kreuzreaktiver Antikörper von der n-terminalen Seite an den pMHC-Komplex andockt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass im MHC-I gebundene Peptide an der c-terminalen Seite an Sauerstoff gebundene Zuckerreste aufweisen können. N-terminal gebundene Zuckerreste an Peptiden im pMHC-I-Komplex wurden bisher nicht gezeigt. Solche Peptide binden lediglich in MHC-II-Molekülen. Im zellulären Immunsystem spielen Zuckerreste eine Rolle bei der Faltung und beim Zusammenbau von Peptid-MHC-Komplexen. Oligosaccharide an Glykoproteinen in der Bindung zwischen TCR und antigenpräsentierenden Zellen sind zudem hilfreich für die richtige Orientierung. (Rudd et al., 2001 und Wolfert and Boons, 2013)

Die Oligosaccharide sind somit zwar nicht essentiell für die immunologische Funktion der pMHC-Komplexe, könnten jedoch durch ihre Größe eine Interaktion mit der schweren Kette des MHC von der c-terminalen Seite her sterisch verhindern.

Dies könnte so den nachgewiesenen Bindungsmodus der distinkt kreuzreaktiven Antikörper mitbedingen.

Weiterhin diskutiert werden sollte, dass vorwiegend bei diesen kreuzreaktiven Serumantikörpern es teilweise nach Einbringen einer Mutation an einer bestimmten Stelle zu einer Zunahme der Bindungsstärke kam. Um dies zu erklären verwende ich das Beispiel bei dem sich der Effekt am effektivsten präsentierte. Das Serum F105 zeigte nach Mutation an Stelle 167 eine Bindungsstärke von fast 500% im Vergleich zum Wildtyp. Man könnte dies durch den Verlust der großen Seitenkette der Aminosäure an dieser Stelle erklären. Tryptophan besitzt als Seitenkette einen aromatischen Ring (Indol). Dieser nimmt konformationell viel mehr Raum als die Methylgruppe des Alanins ein. So könnte der Antikörper näher zum Komplex gelangen und ggf. stärker binden. Man kann daraus folgern, dass diese Stelle ebenso eine größere Rolle bei der Bindung spielt. Was auch zu dem Bindungsverhalten, der drei anderen kreuzreaktiven Serumantikörper passen könnte, da diese durch Mutation an der Stelle 167 alle eine Abschwächung der Bindung zeigten. Auch in den anderen Fällen wobei es zu einer Zunahme

der Bindungsstärke kam, wurde durch Mutation eine längere/größere Seitenkette durch eine kürzere ersetzt.

4 Mögliche Funktion der charakterisierten Antikörper

Nach Herausarbeiten dieser beiden Bindungsmodi stellt sich konsequent die Frage nach der Funktion der Antikörper.

Die Funktion im Menschen ist absolut spekulativ, d.h. deskriptiv.

Antikörper, die die gleichen Epitope wie TCR erkennen zeigen eine ganz neue Dimension zwischen zellulärem und humoralem Immunsystem auf.

Geht man davon aus, dass pMHC-Komplex-spezifische Antikörper auch im Menschen existieren, könnten diese dort ebenfalls mit den T-Zellen interferieren und so z. B. Immunreaktionen regulieren, inhibieren oder kostimulieren, abhängig von ihrer Konzentration im Serum und ihrer Affinität. Bei höherer Affinität könnte eine komplette Verdrängung des TCR aus seiner Bindung erfolgen.

Der Bindungsmodus der distinkt kreuzreaktiven Antikörper zeigte die oben genannten Gemeinsamkeiten mit dem Bindungsmodus eines TCR an einem „super bulged“ Peptid und legte so die Möglichkeit nahe, dass TCR und Antikörper gemeinsam binden könnten.

Durch die Eigenschaft der distinkten Kreuzreaktivität könnten sie potentiell gegen viele HLA-A*0201 restringierten Epitope eine Immunantwort auslösen und so eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunreaktionen einnehmen.

Die Entstehung aller verwendeten Antikörper wurde in Zusammenhang mit einer Schwangerschaft gebracht. Daher lohnt es sich auch über eine Funktion im Rahmen dessen nachzudenken.

Mütterliche Antikörper sind enorm wichtig für die Leihimmunität an das Kind. Diese Antikörper könnten z.B. im Gegensatz zu ihrer bisher bekannten Funktion, extrazelluläre Pathogene zu erkennen, über die MHC-Komplexe auch intrazelluläre Pathogene erkennen und so evtl. das Komplementsystem aktivieren, welches bei Neugeborenen im Gegensatz zur zellulären Abwehr sehr früh funktionsfähig wird (Adinolfi, 1977; Simpson et al., 1993).

Auf diesem Wege könnte das Neugeborene effektiv vor viralen Infekten geschützt werden. Zudem wird diese Theorie dadurch unterstützt, dass es sich hierbei auch sogar um die Komplement-aktivierenden Unterklassen IgG1 und IgG3 der Antikörper handelt. Eine komplementabhängige Lyse konnte bereits von gezeigt werden (Held et al., 2015).

5 Ausblick

MCH-Peptid-spezifische Antikörper könnten ein erfolgversprechendes Vorhaben sein um unspezifische immunsuppressive Therapien effektiver zu gestalten und nur ausgewählte Immunreaktionen zu unterdrücken. Unspezifische Immuntherapien zeigen oft ein großes Nebenwirkungsspektrum von opportunistischen Infektionen bis hin zu nachweislich einem erhöhten Auftreten maligner Neoplasien (Andres, 2005).

Diese neuen Möglichkeiten könnten z.B. eine große Rolle bei der Unterdrückung von Graft versus Host Reaktionen nach Stammzelltransplantation einnehmen, da dort bereits zahlreiche Antigene identifiziert wurden, die zu dieser Alloreaktivität gegen das transplantierte Immunsystem führen. Es scheint nun denkbar, dass mit diesen MHC-Peptid-spezifischen Antikörpern eine gezielte Blockade einer Immunreaktion stattfinden könnte. Reagieren diese Antikörper nur auf das bestimmte Antigen, könnten sie so ggf. den TCR aus seiner Bindung verdrängen und die Immunreaktion verhindern. Dass eine solche Verdrängung möglich ist, wurde bereits wie oben beschrieben 2009 von Neumann et al. gezeigt.

Jedoch haben Immuntherapien, die nur T-Zellen beeinflussen, auch ihre Grenzen, da bei den meisten Autoimmunkrankheiten mehrere verschiedene Zellen und Komponenten des Immunsystems involviert sind.

Es lohnt sich jedoch in diese Forschung weiterhin zu investieren. Denn auch wenn eine Möglichkeit gefunden werden könnte durch diese pMHC-Komplex-spezifischen Antikörper eine Immunreaktion gezielt zu verstärken oder eine gezielte Kompletaktivierung auszulösen, ergibt sich hieraus großes Potential. Insbesondere auch für neuere Krebstherapien. Wobei sich dies jedoch deutlich schwieriger gestalten könnte als oben beschriebene Möglichkeit. Denn Krebszellen besitzen häufig Escape-Mechanismen mit denen sie sich der Erkennung durch das Immunsystem entziehen können. Dazu gehören die Reduktion der Anzahl von MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Oberfläche bis hin zum kompletten Verlust dieser (Cabrera et al., 2000). Weiterhin weisen tumorassoziierte Antigene eine geringe Expressionsrate in der Zelle auf und erscheinen auch durch ineffiziente Prozessierung sehr selten als pMHC-Komplex auf der Zelloberfläche. Zum Beispiel wurde eine niedrige Prozessierungseffizienz von Melan A nachgewiesen (Held et al. 2007).

6 Zusammenfassung und Kritik

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der Bindungsmodus einer neuen Art von Antikörpern herausgearbeitet werden. Wir benutzten HLA-A*0201 als Modell, da es sich hierbei um das am häufigsten in der weißen Bevölkerung vorkommende Allel eines HLA der Klasse I handelt. Das Influenza Matrix Protein bot sich als Antigen an, da Influenza ein in der Bevölkerung häufig vorkommender Virus mit oft repetitiven akuten Immunreaktionen ist und so eine hohe Durchseuchungsrate besteht. Die Seren wurden auch auf pMHC-Komplexe getestet, welche von CMV

abstammende Peptide gebunden hatten. Es ergab sich dabei aber nur in einem Serum ein passender Antikörper (Held et al. 2015).

Die Arbeit fokussierte sich lediglich auf 8 Seren, welche eine Bindung gegen HLA-A*0201/IMP₅₈₋₆₆-Komplexe zeigten. Dies stellt jedoch nur einen sehr kleinen Bruchteil dessen dar, was aufgrund der großen Diversität des HLA-Systems zu erwarten wäre. Es wurde sich ausschließlich auf das IMP-Peptid beschränkt. Die Vielzahl an möglichen Peptiden ist aber nicht erfasst. Aus diesem Grund handelt es sich hierbei um eine eingeschränkte Sichtweise und eine Verallgemeinerung auf den Bindungsmodus dieser neuen Kategorie der Antikörper wäre noch nicht zulässig. Jedoch konnten mit dieser Arbeit Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion dieser Antikörper gesammelt werden.

Da solche Antikörper bisher nie beschrieben wurden, ergibt sich hieraus eine ganz neue Sicht auf unser Immunsystem und bietet viel Raum für weitere Forschungen.

Appendix

1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Aufbau eines IgG-Antikörpers
- Abb. 2: Organisation des Genclusters der schweren und leichten Kette von Immunglobulinen
- Abb. 3: Schematische Darstellung eines MHCI-Moleküls
- Abb. 4: Struktur eines pMHC-Komplexes aus Sicht des TCR
- Abb. 5: Bindungsstellen des TCR am HLA-A*0201
- Abb. 6: Gel Shift Assay + SA
- Abb. 7: Reinigung der p-MHC-Komplexe
- Abb. 8: Kontrolle mit Tü 155
- Abb. 9: Kontrolle mit w6/32, BB7.2, HB28 und MG
- Abb. 10: Bindungsverhalten des Serum V19.0 als Beispiel für alle nicht kreuzreaktiven Seren
- Abb. 11: Bindungsverhalten des Serum S22 als Beispiel für alle kreuzreaktiven Seren
- Abb. 12: Aminosäuresequenzen
- Abb. 13: Kontrolle Bindungsverhalten der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifischen Antikörper
- Abb. 14: Kontrolle Bindungsverhalten der kreuzreaktiven Antikörper
- Abb. 15: Titrationskurven der Seren auf den verschieden mutierten IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplexen
- Abb. 16: Bindungsverhalten kreuzreaktive Seren in Prozent zum Wildtyp
- Abb. 17: Bindungsverhalten IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex-spezifische Seren in Prozent zum Wildtyp
- Abb. 18: Räumliche Darstellung der eingebrachten Mutationen im HLA-A*0201-Komplex
- Abb. 19: Model des HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutationen der schweren Kette auf das Bindungsverhalten der kreuzreaktiven Serumantikörper

Abb. 20: Model des HLA-A*0201-Komplexes mit Darstellung der Effekte verschiedener Mutationen der schweren Kette auf das Bindungsverhalten der IMP₅₈₋₆₆/HLA-A*0201-Komplex spezifischen Serumantikörper

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Peptide, Antikörper und Färbereagenzien

Tabelle 3: Eingebrachte Mutationen

3 Literaturverzeichnis

Adinolfi, M. (1977). Human complement: onset and site of synthesis during fetal life. *Am J Dis Child*, 131, 1015-1023.

Altman, J.D., Davis, M.M. (2003). MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. *Curr Protoc Immunol*, 53, 17.3.1–17.3.33.

Andres, A. (2005). Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol*, 56, 71-85.

Babbitt, B., Allen, P., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature*, 317, 359-361.

Baker, B.M., Turner, R.V., Gagnon, S.J., Wiley, D.C., Biddison, W.E. (2001). Identification of a crucial energetic footprint on the alpha helix of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 that provides functional interactions for recognition by tax peptide/HLA-A2-specific T cell receptors. *J Exp Med*, 193, 551-562.

Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., Rousset, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science*, 251, 70-72.

Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F., Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens—new tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-20.

Basso, K., Dall-Favera R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, 15, 172-184.

Bentzen, A.K., Hadrup, S.R. (2017). Evolution of MHC-based technologies used for detection of antigen-responsive T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 66, 657-666.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329, 506-512.

Bottazzo, G. F., Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T., Feldmann, M. (1983). Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*, 2, 1115-1119.

Cabrera, T., Salinero, J., Fernandez, M. A., Garrido, A., Esquivias, J., Garrido, F. (2000). High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol*, 61, 499-506.

Cambier, J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol*, 155, 3281-3285.

Chames, P., Hufto, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B., Hoogenboom, H.R. (2000). Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab-library. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 7969-7974.

Chan, K.F., Gully, B.S., Grs, S., Beringer, D.X., Kjer-Nielsen, L., Cebon, J., McCluskey, J., Chen, W., Rossjohn, J. (2018). Divergent T-cell receptor recognition modes of a HLA-I restricted extended tumor-associated peptide. *Nat Commun*, 9, 1026.

Choi, J., Enis, D. R., Koh, K. P., Shiao, S. L., Poher, J. S. (2004). T-lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol*, 22, 683-709.

Chu, K., Niu, X.H., Williams, L.T. (1995). A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natel Acad Sci*, 92, 11894-11898.

Clevers, H., Alacron, B., Wileman, T., Terhorst, C. (1988). The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*, 6, 629-662.

Constant, S.L., Bottomly, K. (1997). Induction of TH1 and TH2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 15, 297-322.

Cruz, M.S., Diamond, A., Russel, A., Jameson, J.M. (2018). Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in skin immunity and disease. *Front Immunol*, 9, 1304.

D'Amato, G., Liccardi, G., Noschese, P., Salzillo, A., D'Amato, M., Cazolla, M. (2004). Anti-IgE monoclonal antibody (omalizumab) in the treatment of atopic asthma and allergic respiratory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3, 227-229.

Davis, M.M., Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334, 395-402.

Defrance, T., Taillardet, M., Genestier, L. (2011). T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol*, 23, 330-336.

de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W., Hoogenboom, H.R. (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem*, 274, 18218-18230.

Engvall, E., Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa: III. Quantification of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, 109, 129-135.

Fahnestock, M.L., Tamir, I., Narhi, L., Bjorkman, P.J. (1992). Thermal stability comparison of purified empty and peptide-filled forms of a class I MHC molecule. *Science*, 258, 1658-1662.

Garboczi, D.N., Hung, D.T., Wiley, D.C. (1992). HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 3429-3433.

Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., Wilson, I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, 274, 209-219.

Gauss, G.H., Lieber, M.R. (1996). Mechanistic constraints on diversity in human V (D) J recombination. *Mol Cell Biol*, 16, 258-269.

Gill, S.C., von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 182, 319-326.

Goldberg, A.L., Rock, K.L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, 357, 375-379.

Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435, 590-597.

Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 173, 1213-1225.

Hedrick, S., Cohen, D., Nielson, E., Davis, M. M. (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. *Nature*, 308, 149-155.

Held, G., Matsuo, M., Epel, M., Gnjatich, S., Ritter, G., Lee, S.Y., Tai, T.Y., Cohen, C.J., Old, L.J., Pfreundschuh, M., Reiter, Y., Hoogenboom, H.R., Renner, C. (2004). Dissecting cytotoxic T cell responses towards the NY-ESO-1 protein by peptide/MHC-specific antibody fragments. *Eur J Immunol*, 34, 2919-2929.

Held, G., Wadle, A., Dauth, N., Stewart-Jones, G., Sturm, C., Thiel, M., Zwick, C., Dieckmann, D., Schuler, G., Hoogenboom, H.R., Levy, F., Cerundolo, V., Pfreundschuh, M., Renner, C. (2007). MHC-peptide-specific antibodies reveal inefficient presentation of an HLA*0201-restricted, Melan-A-derived peptide after active intracellular processing. *Eur J Immunol*, 37, 2008-2017.

Held, G., Luescher, I.F., Neumann, F., Papaioannou, C., Schirmann, T., Sester, M., Smola, S., Pfreundschuh, M. (2015). MHC/peptide-specific interaction of the humoral immune system: a new category of antibodies. *J Immunol*, 195, 4210-4217.

Hilton, H.G., Parham, P. (2013). Direct binding to antigen-coated beads refines the specificity and cross-reactivity of four monoclonal antibodies that recognize polymorphic epitopes of HLA class I molecules. *Tissue Antigens*, 81, 212-220.

Hozumi, N., Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci*, 73, 3628-3632.

Hutte, H., Hammer, A., Blaschitz, A., Hartmann, M., Ebbesen, P., Dohr, G., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B. (1996). Expression of HLA class I molecules in human first trimester and term placenta trophoblast. *Cell Tissue Res*, 286, 439-447.

Katz, D., Hamaoka T., Benacerraf, B. (1973). Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes II. Failure of physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates. *J Exp Med*, 137, 1405-1418.

Kisielow, P., Teh, H.S., Blüthmann, H., von Boehmer, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T-cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature*, 335, 730-733.

Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 8, 22-33.

Klein, J., Sato, A. (2000). The HLA System. *The New England Journal of Meicine*, 7, 702-709.

Landsteiner, K., van der Scher, J. (1936). On cross reactions of immune sera to azoproteins. *J Exp Med*, 63, 325-339.

Leisner, C., Loeth, N., Lamberth, K., Justesen, S., Sylvester-Hvid, C., Schmidt, E.G., Claesson, M., Buus, S., Stryhn, A. (2008). One-Pot, Mix-and-Read Peptide-MHC Tetrameres. *PloS ONE*, 3, e1678.

Li, Y.S., Hayakawa, K., Hardy, R.R. (1993). The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J Exp Med*, 178, 951-960.

Liu, Y.C., Miles, J.J., Neller, M.A., Gostick, E., Price, D.A., Purcell, A.W., McCluskey, J., Burrows, S.R., Rossjohn, J., Gras, S. (2013). Highly divergent T-cell receptor binding modes underlie specific recognition of a bulged viral peptide bound to a human leukocyte antigen class I molecule. *J Biol Chem*, 288, 15442-15454.

Loubière, L.S., Lambert, N.C., Flinn L.J., Erickson, T.D., Yan, Z., Guthrie, K.A., Vickers, K.T., Nelson, J.L. (2006). Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab Invest*, 86, 1185-1192.

Maloney, S., Smith, A., Furst, D.E., Myerson, K., Rupert, K., Evans, P.C., Nelson, J.L. (1999). Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest*, 104, 41-47.

Marbach, A., Bettenbrock, K. (2012). lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol*, 157, 82-88.

Mikulak, J., Oriolo, F., Bruni, E., Roberto, A., Colombo, F.S., Villa, A., Bosticardo, M., Bortolomai, I., Lo Presti, E., Meraviglia, S., Dieli, F., Vetrano, S., Danese, S., Della Bella, S., Carvello, M.M., Sacchi, M., Cugini, G., Colombo, G., Klinger, M., Spaggiari, P., Roncalli, M., Prinz, I., Ravens, S., di Lorenzo, B., Marcenaro, E., Silva-Santos, B., Spinelli, A., Mavilio, D. (2019). NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial V δ 1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. *JCI Insight*, 4, e125884.

Nishana, M., Raghavan, S.C. (2012). Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology*, 137, 271-281.

Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N., Woernley, D.L. (1960). Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Arch Biochem Biophys*, 89, 230-244.

Osmond, D.G., Rolink, A., Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today*, 19, 65-68.

Papavasiliou, F.N., Schatz, D.G. (2002). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, 109, S35-S44.

Patel, K.J., Neuberger, M.S. (1993). Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the α/β sheath and occurs independently of its cytoplasmatic tyrosines. *Cell*, 74, 939-946.

Pernis, B., Forni, L., Amante, L. (1970). Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes, *J Exp Med*, 132, 1001-1018.

Pernis, B., Forni, L., Amante, L. (1971). Immunoglobulins as cell receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 190, 420-431.

Pokrass, M.J., Liu, M.F., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P. (2013). Activation of complement by monoclonal antibodies that target cell-associated $\beta 2$ -microglobulin: Implications for cancer immunotherapy. *Mol Immunol*, 56, 549-560.

Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J*, 73, 119-126.

Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. (1980). The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, 19, 821-827.

Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, 10, 97-121.

Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S.R., van Esch, W.J.E., Molenaar, A.M., Schumacher, T.N.M., Ovaas, H. (2006). Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nat Protoc*, 1, 1120-1132.

Rosenthal, A., Shevach, E. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med*, 138, 1194-1212.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*, 24, 419-466.

Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A., Dwek, R.A. (2001). Glycosylation and the Immune System. *Science*, 291, 2370-2376.

Schroeder, H.W., Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 42-52.

Seppanen, E., Fisk, N.M., Khosrotehrani, K. (2013). Pregnancy-acquired fetal progenitor cells. *J Reprod Immunol*, 97, 27-35.

Simpson, K.L., Houlihan, J.M., Holmes, C.H. (1993). Complement regulatory proteins in early human fetal life: CD59, membrane co-factor protein (MCP) and decay-accelerating factor (DAF) are differentially expressed in the developing liver. *Immunology*, 80, 183-190.

Smith, K.A. (2014). Toward a molecular understanding of adaptive immunity: a chronology, part III. *Front Immunol*, 5, 1-14.

Starr, T.K., Jameson, S.C., Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 139-176.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., Schrader, C. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*, 26, 261- 292.

Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, 335, 229-233.

Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M.C., Lapointe, R. (2012). Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *OncoImmunology*, 6, 908-916.

Trombetta, E.S. und Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, 23, 975-1028.

Wadle, A., Held, G., Neumann, F., Kleber, S., Wuellner, B., Asemissen, A.M., Kubuschok, B., Scheibenbogen, C., Breining, T., Meyerhans, A., Renner, C. (2006). Cross-presentation of HLA class I epitopes from influenza matrix protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccine*, 24, 6272-6281.

Wagner, S.D., Neuberger, M.S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, 14, 441-457.

Wang, Z., Turner, R., Baker, B.M., Biddison, W.E. (2002). MHC allele-specific molecular features determine peptide/HLA-A2 conformations that are recognized by HLA-A2-restricted T cell receptors. *J Immunol*, 169, 3146-3154.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25, 821-851.

Williams, D.C., Van Frank, R.M., Muth, W.L., Burnett, J.P. (1982). Cytoplasmatic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*, 215, 687-689.

Wolfert, M.A., Boons, G. (2013). Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat Chem Biol*, 9, 776-784.

Zinkernagel, R., Doherty, P. (1974). Restriction of in vitro T-cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248, 701-702.

4 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Held. Vielen Dank für das Angebot meine Arbeit im José Carreras Center für Immun- und Gentherapie der Abteilung Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie der Inneren Medizin I erstellen zu dürfen. Vielen Dank für das interessante Thema und die zu jeder Zeit entgegenbrachte Unterstützung. Er hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen und immer neue gute Anregungen parat.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Michael Pfreundschuh unter dessen Leitung die Klinik der Inneren Medizin I bis ins Jahr 2019 stand.

Weiterhin bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Held im José Carreras Zentrum zu großem Dank verpflichtet. Sie standen mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite und lernten mich kompetent in alle Tätigkeiten im Labor ein. Auch bei allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen möchte ich mich für ein gutes Arbeitsklima und eine stets freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Großer Dank gebührt zudem all meinen guten Freunden und meinem Lebensgefährten, die immer an mich geglaubt haben und mich ermutigt haben diese Arbeit fertig zu stellen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester danken, die es mir erst ermöglicht haben Medizin zu studieren und mich zu jeder Zeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

5 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.